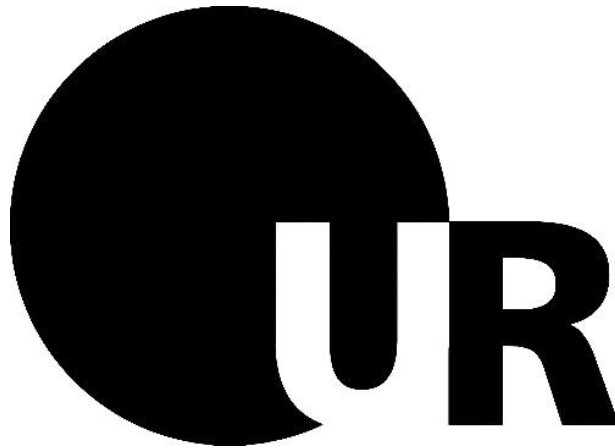


**Der Einfluss von PDGF-BB auf die Rekrutierung von
reninexprimierenden Zellen in der Niere**



DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Verena Rupp

aus Roth

im Jahr 2016

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner

2. Gutachter: Herr PD Dr. Andreas Ohlmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2016

Die Arbeit wurde angeleitet von: Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
2	EINLEITUNG	8
2.1	Renale präglomeruläre Blutgefäßentwicklung	8
2.2	Renin-Angiotensin-System	11
2.3	Renin	14
2.3.1	Reninexpression im embryonalen und adulten Organismus	14
2.3.2	Reninsynthese und -sekretion	16
2.3.3	Regulation der Reninsynthese und -sekretion	17
2.3.3.1	Nierenperfusion und systemischer Blutdruck	17
2.3.3.2	Salzhaushalt	17
2.3.3.3	Sympathisches Nervensystem	18
2.3.3.4	Weitere Einflussfaktoren auf Reninsynthese und -sekretion	19
2.4	Platelet derived growth factor (PDGF)	19
2.4.1	Isoformen der PDGF-Familie	19
2.4.2	PDGF-Rezeptoren und Signaltransduktion	20
2.4.3	Expression von PDGF-Rezeptoren und -Liganden	22
2.4.4	Physiologische Funktionen von PDGF	22
2.4.5	Beteiligung von PDGF bei pathologischen Prozessen	23
2.4.5.1	Beteiligung von PDGF bei pathologischen Prozessen in verschiedenen Organen	23
2.4.5.2	Beteiligung von PDGF bei pathologischen Prozessen in der Niere	24
2.5	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	26
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Material	27
3.1.1	Geräte	27
3.1.2	Verbrauchsmaterial	29

3.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits	29
3.1.4	Primer	31
3.1.5	Antikörper	31
3.1.6	Lösungen und Puffer	31
3.1.7	Software und Internetdienste	33
3.2	Methoden	33
3.2.1	Versuchstiere	33
3.2.2	Retrograde arterielle Perfusion	34
3.2.3	Paraffinschnitte	35
3.2.4	Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung	35
3.2.5	Mikroskopie und Bilddigitalisierung	36
3.2.6	Dreidimensionale Rekonstruktion	36
3.2.6.1	Axiovision	36
3.2.6.2	ImageJ	36
3.2.6.3	Amira	37
3.2.7	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.7.1	RNA-Isolierung	40
3.2.7.2	cDNA-Synthese	41
3.2.7.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-Time-quantitative-PCR)	42
3.2.7.4	Genotypisierung	43
3.2.8	Statistische Methoden	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	Quantitative Analyse der Reninexpression mittels Renin-mRNA-Bestimmung	46
4.2	Histologische und dreidimensionale Analyse des arteriellen Gefäßsystems und der Reninexpression in der Niere	48
4.2.1	Histologie der Gefäßstruktur und der Reninverteilung in der Niere der Tie-2 ^{+/+} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus am ersten Tag post partum	49
4.2.2	Histologie der Gefäßstruktur und der Reninverteilung in der Niere der Tie-2 ^{+/Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus am ersten Tag post partum	50
4.2.3	Wanddicke der afferenten Arteriole von Tie-2 ^{+/+} -PDGF-BB ^{fl/fl} - und Tie-2 ^{+/Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus am ersten Tag post partum	51

4.2.4	Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2 ^{+/+} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus	52
4.2.5	Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2 ^{+Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus	55
4.2.6	Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2 ^{+/+} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus unter Niedrigsalz-Enalaprildiät	58
4.2.7	Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2 ^{+Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus unter Niedrigsalz-Enalaprildiät	61
5	DISKUSSION	64
5.1	Vergleichende Analyse der Renin-mRNA-Spiegel	64
5.2	Vergleichende Analyse der histologischen Schnitte und rekonstruierten Gefäßbäume	65
5.2.1	Histologie der Gefäßstruktur und der Reninverteilung in der Niere der Tie-2 ^{+/+} -PDGF-BB ^{fl/fl} - und der Tie-2 ^{+/+} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus im Vergleich	66
5.2.2	Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2 ^{+Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} - und Tie-2 ^{+Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus im Vergleich	66
5.2.3	Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2 ^{+Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} - und Tie-2 ^{+Cre} -PDGF-BB ^{fl/fl} -Maus unter LSE-Diät im Vergleich	68
5.2.4	Zusammenfassende Analyse der histologischen Schnitte und rekonstruierten Gefäßbäume	69
6	ANHANG	72
6.1	Veröffentlichung	72
6.2	Abbildungsverzeichnis	73
6.3	Abkürzungsverzeichnis	75
6.4	Literaturverzeichnis	79
6.5	Erklärung	96

1 Zusammenfassung

Der Mechanismus, über den Reninzellen während der renalen Entwicklung aus dem mesenchymalen Gewebe zur Gefäßwand gelangen und dort in diese integriert werden, wurde noch nicht beschrieben. Außerdem ist unklar, welche Faktoren die Rekrutierung von reninbildenden Zellen aus dem Mesenchym zu den Gefäßwänden hin induzieren und begünstigen. Perizyten, die wie reninexprimierende Zellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der Foxd1⁺-Zelle, abstammen, werden während der renalen Gefäßentwicklung über endothelial synthetisiertes PDGF-BB aktiviert und in sich entwickelnde Gefäßwände integriert. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit der PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg und sein Einfluss auf die Reninzelldifferenzierung und -entwicklung sowie auf die präglomeruläre arterielle Gefäßstruktur mit Hilfe von Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen genauer untersucht. Dabei ergab sich, dass bei Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen am ersten Tag post partum im Vergleich zu Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren zum gleichen Entwicklungszeitpunkt eine verminderte Wanddicke der afferenten Arteriole auftritt. In der Höhe der Renin-mRNA-Spiegel sowie der Lokalisation der Reninzellen in der Tunica media afferenter Arteriolen dieser Versuchsgruppe liegen aber keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus vor. Bei adulten Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Tieren zeigen weder die Menge, Lokalisation und Verteilung von reninexprimierenden Zellen in der Niere noch der präglomeruläre arterielle Gefäßbaum hinsichtlich seiner Morphologie Auffälligkeiten. Die Renin-mRNA-Level von Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Tieren sind gegenüber Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Tieren in allen drei untersuchten Entwicklungsstadien (Embryonaltag 18, postpartal Tag 1, Adultstadium) in nicht signifikantem Ausmaß vermindert. Durch eine Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems mit Hilfe einer Niedrigsalz-Enalapridlät erfolgt, übereinstimmend mit einem gleichartigen Phänomen bei Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen, eine retrograde Rekrutierung von reninproduzierenden Zellen in proximal gelegenen Anteilen afferenter Arteriolen sowie in geringem Anteil auch in Interlobulararterien. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich folgern, dass der PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg keine beziehungsweise nur äußerst geringe Relevanz für die Integration von reninexprimierenden Zellen in die Gefäßwand sowie die Rekrutierung von Reninzellen zu ihrer typischen Position in der Tunica media von afferenten Arteriolen besitzt.

2 Einleitung

2.1 Renale präglomeruläre Blutgefäßentwicklung

Die Vaskularisierung der Niere erfolgt im Zusammenspiel mit der epithelialen Nephrogenese (Sariola *et al.* 1991; Sequeira Lopez & Gomez 2011). Zur Entwicklung des renalen arteriellen Gefäßbaums tragen sowohl die Prozesse der Angiogenese als auch der Vaskulogenese bei (Gomez *et al.* 1997). Im Frühstadium der Nierenentwicklung ist die Vaskulogenese von größerer Bedeutung, in späteren Stadien die Angiogenese (Sequeira Lopez & Gomez 2011). Als Angiogenese bezeichnet man die Neubildung von Blutgefäßen durch Aussprossung aus bereits existierenden Gefäßen. Hierzu trägt die Migration und Proliferation von bereits differenzierten endothelialen Zellen bei, die eine Rekrutierung perivaskulärer Zellen beeinflusst. Unter Vaskulogenese versteht man die *de novo* Synthese von Blutgefäßstrukturen aus endothelialen Vorläuferzellen wie Angioblasten. Progenitorzellen differenzieren sich, assemblieren lokal und bilden Endothelröhren aus. Anschließend kommt es zur Rekrutierung lokaler mesenchymaler Zellen, die sich zu glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren und den neu gebildeten Gefäßen Stabilität verleihen (Risau *et al.* 1988; Risau 1997; Sequeira Lopez & Gomez 2011). Im Zuge der Vaskulogenese und Angiogenese entstehen unter dem Einfluss von VEGF von endothelialen Zellen gesäumte Gefäßröhren (Carmeliet *et al.* 1996; Stratman & Davis 2012a). Auf ihrer abluminalen Seite erfolgt eine Rekrutierung von perivaskulären Zellen wie glatten Muskelzellen und Perizyten, welche die Gefäßstruktur stabilisieren sowie entscheidend zur weiteren Gefäßreifung und -verlängerung beitragen. Hierbei interagieren Perizyten und Endothelzellen über lösliche parakrine und membrangebundene Faktoren (Stratman & Davis 2012b). Wichtige Stimulanzen für die Perizytenintegration in die Gefäßwand, für die vaskuläre Entwicklung sowie für die parakrine Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten sind endothelial produziertes PDGF-BB (platelet derived growth factor BB), VEGF (vascular endothelial growth factor), Angiopoietine, TGF- β (transforming growth factor beta), HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) und die Notchsignalkaskade (Risau & Ekblom 1986; Risau *et al.* 1992; Suri *et al.* 1996; Hirschi *et al.* 1998; McCright *et al.* 2001b; Sequeira Lopez & Gomez 2011). Diese Wachstumsfaktoren binden an entsprechende Rezeptoren auf Perizyten und üben so ihre Wirkung aus (Sequeira Lopez & Gomez 2011). Endothelial synthetisiertes PDGF-BB vermittelt seine Effekte über

den PDGF- β -Rezeptor (PDGFR- β) auf Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen (Sundberg *et al.* 1993; Hellström *et al.* 1999). PDGF-BB ist essentiell für die Rekrutierung von Perizyten und vaskulären Glattmuskelzellen hin zu sich entwickelnden endothelialen Zellröhren und der damit einhergehenden vaskulären Basalmembranentwicklung (Hellström *et al.* 1999; Lindblom *et al.* 2003; Stratman *et al.* 2009). So korreliert eine deutlich verminderte Anzahl von Perizyten um Mikrogefäße bei einem selektiven Knockout (KO) der PDGF-B-Kette in endothelialen Zellen während der renalen Entwicklung mit mikrovaskulären Schäden wie Mikroaneurysmen, unregelmäßigen Durchmessern der Mikrogefäße sowie einer unregelmäßigen Kapillardichte (Enge *et al.* 2002; Bjarnegard *et al.* 2004). Diese Veränderungen könnten bedingt sein durch verminderte Proliferation, gestörtes Überleben und/oder reduzierte Rekrutierung von Perizyten (Stratman & Davis 2012b). Bei einer kompletten Inaktivierung der PDGF-B-Kette während der Nephrogenese treten, einhergehend mit einem Fehlen von Mesangialzellen, fehlentwickelte Glomeruli mit nur einer oder wenigen aneurysmaartigen Kapillaren, generalisierte Ödeme und schwere Hämorrhagien mit Erythroblastose, Anämie sowie Thrombozytopenie auf. Diese Entwicklungsstörungen sind verantwortlich für den perinatalen Tod der Versuchstiere (Levéen *et al.* 1994). Ähnliche Störungen (Fehlen von Mesangialzellen, Anämie, Thrombozytopenie, Hämorrhagien und abnorm entwickelte Glomeruli ohne Kapillarknäuel) treten bei einem generellen Knockout des PDGF- β -Rezeptors auf (Soriano 1994). Außerdem fehlen bei einer kompletten Inaktivierung der PDGF-B-Kette mikrovaskuläre Perizyten und es kommt zum Auftreten von kapillären Aneurysmen (Lindahl *et al.* 1997).

Der Notchsignalweg ist von großer Bedeutung für die Entwicklung von Endothel-, Renin-, Mesangial- und vaskulären Glattmuskelzellen (Limbourg 2005; Morrow *et al.* 2008; Castellanos Rivera *et al.* 2011; Boyle *et al.* 2014; Lin *et al.* 2014). So ist die basale Reninsyntheserate bei einer konditionalen Deletion von RBP-J (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region), dem transkriptionellen Effektor des Notchsignalwegs, in Zellen der Reninlinie im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Außerdem wird im adulten Organismus eine verminderte Rekrutierung von Reninzellen bei chronischer Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems durch Nidrigsalz-Captoprildiät beobachtet (Castellanos Rivera *et al.* 2011). Des Weiteren führt eine Deletion von Notch2 zu Aneurysmen sowie teilweise zu einer fehlenden Ausbildung des glomerulären Kapillarnetzes und zu hypoplastischen Nieren (McCright *et al.* 2001a). Der Reninpromotor wird durch die intrazelluläre Domäne von Notch1 aktiviert (Pan *et al.* 2005a).

VEGF stimuliert über Flt-1- und Flk-1-Rezeptoren die Aktivierung und Bildung von endothelialen Zellen (Tufro-McReddie *et al.* 1997; Tufro *et al.* 1999; Mattot *et al.* 2002). VEGF-KO-Mäuse weisen eine verspätete Entwicklung und eine pathologische Akkumulation endothelialer Zellen auf. Außerdem treten bei diesen Versuchstieren bei der Gefäßausbildung Unregelmäßigkeiten wie vergrößerte Gefäßdurchmesser und eine verminderte sowie fehlerhafte Bildung größerer Gefäße auf (Carmeliet *et al.* 1996). Flk-1-KO-Mäuse versterben am 8./9. Embryonaltag, was auf einen Defekt in der Entwicklung von hämatopoietischen und endothelialen Zellen sowie der hiermit verbundenen Ausbildung des vaskulären Systems zurückzuführen ist (Shalaby *et al.* 1995). Flt-1-KO-Mäuse sind zwar in der Lage endotheliale Zellen auszubilden, diese assemblieren aber gruppenweise in dilatierten, mit weiteren Gefäßen fusionierenden Gefäßtuben (Fong *et al.* 1995).

Aufgrund des Nachweises von endothelialen Vorläuferzellen im humanen Blut ist eine Neubildung von Blutgefäßen (Neovaskulogenese) auch im adulten Organismus anzunehmen (Asahara *et al.* 1997; Murohara *et al.* 2000). Im hypoxischen Gewebe spielt VEGF bei dieser adulten Neovaskulogenese eine wichtige Rolle (Li *et al.* 2006). Im Adultstadium sind vor allem Angiogeneseprozesse von großer Bedeutung. Die Angiogenese ist Bestandteil sowohl von physiologischen Vorgängen wie beispielsweise Wundheilung und plazentarer Angiogenese als auch von pathologischen Mechanismen wie z.B. tumorinduzierter Angiogenese und diabetischer Retinopathie (Folkman 1971; Rand 1981; Hunt *et al.* 1984; Reynolds & Redmer 2001).

Die renale Blutgefäßentwicklung bei der Maus beginnt am zwölften Embryonaltag (E12) mit der Entwicklung der A. renalis (Arteria renalis). Im Folgenden bilden sich durch Aufzweigung der A. renalis am 13. Embryonaltag zunächst die Interlobararterien. Durch erneute Verzweigungen der Interlobararterien am 13. sowie 14. Embryonaltag werden Aa. arcuatae gebildet, welche sich wiederum in Aa. interlobulares und diese schließlich in Aa. afferentes (E15) aufteilen. Die afferenten Arteriolen münden in das Kapillarnetz des Glomerulus, aus dem weiter distal efferente Arteriolen hervorgehen (Sauter *et al.* 2008). Dieses komplexe intrarenale Verzweigungsmuster entsteht durch Sprossung und Intussuszeption, zwei Mechanismen der Angiogenese (Makanya *et al.* 2005).

2.2 Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) dient hauptsächlich der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts des Körpers und ist somit eng mit der Blutdruckeinstellung verknüpft (Davis & Freeman 1976; Wagner & Kurtz 1998). Außerdem scheint es bei hypertrophen und fibrotischen Vorgängen eine Rolle zu spielen (Castrop *et al.* 2010). Man unterscheidet zwischen einem systemischen sowie mehreren lokalen Renin-Angiotensin-Systemen, welche in unterschiedlichen Organen (z.B. kardiovaskuläres System, Niere und Nervensystem) beschrieben wurden (Paul *et al.* 2006). Durch unterschiedliche Stimuli (siehe 2.3.3) wird die Signalkaskade des klassischen, systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems ausgelöst. Die vor über 100 Jahren erstmals beschriebene Aspartylprotease Renin wird aus granulierten juxtaglomerulären (JG-) Epitheloidzellen der Niere ins Blutplasma sezerniert und spaltet dort spezifisch das in der Leber produzierte α -Glykoprotein Angiotensinogen zum physiologisch inaktiven Dekapeptid Angiotensin I (ANG I) (Tigerstedt & Bergman 1898; Menard *et al.* 1983; Hackenthal *et al.* 1990; Hall 2003). Dieses wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) mittels Abspaltung der beiden C-terminalen Aminosäuren Histidin und Leucin in das Oktapeptid Angiotensin II (ANG II; Aminosäuresequenz Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) umgewandelt (Skeggs *et al.* 1956; Hackenthal *et al.* 1990). Exprimiert wird das ACE hauptsächlich von Endothelzellen der Lungengefäße, aber auch von Endothelzellen der Nierengefäße und zahlreichen anderen Zelltypen (NG & Vane 1967; Wallace *et al.* 1978). Das Peptidhormon ANG II ist der Haupteffektor des RAS und entfaltet seine vielfältige und komplexe Wirkung über AT₁- und AT₂-Rezeptoren (Angiotensin II-Rezeptor Typ 1/2), deren physiologische Effekte sich zum Teil antagonistisch zueinander verhalten (Lin & Goodfriend 1970; Inagami *et al.* 1999; Gasparo *et al.* 2000). Die meisten bekannten Effekte von ANG II werden über AT₁-Rezeptoren vermittelt. AT₂-Rezeptoren finden sich vorwiegend im embryonalen Organismus sowie in geringerem Ausmaß als AT₁-Rezeptoren auch im adulten Gewebe (Gasparo *et al.* 2000). So weisen in der Niere während der Embryonalperiode mesenchymale Zellen, Glomeruli, Tubuli und renale Gefäßmuskulzellen AT₂-Rezeptoren auf (Kakuchi *et al.* 1995; Ozono *et al.* 1997). Im Adultstadium werden AT₂-Rezeptoren hauptsächlich von renalen interstitiellen Zellen und im Glomerulus exprimiert (Ozono *et al.* 1997). AT₁-Rezeptoren finden sich im adulten Organismus beispielsweise auf Hepatozyten, Zellen der Zona glomerulosa der Nebenniere, Endothelzellen und vaskulären Glattmuskulzellen sowie auf Fibroblasten und Zellen des

endokrinen Systems (Murphy *et al.* 1991; Paxton *et al.* 1993; Ardaillou 1999; Inagami *et al.* 1999; Gasparo *et al.* 2000). In der Niere werden AT₁-Rezeptoren durch Mesangialzellen, Podozyten und vaskuläre Glattmuskelzellen von kleineren Arterien sowie von afferenten und efferenten Arteriolen exprimiert. Außerdem lässt sich der AT₁-Rezeptor in renalen Sammelrohrzellen, Zellen der Macula densa (MD) sowie proximalen und distalen Tubuli nachweisen (Paxton *et al.* 1993; Harrison-Bernard *et al.* 1997; Miyata *et al.* 1999). Eine Aktivierung der AT₁-Rezeptoren führt zu Vasokonstriktion und hierdurch zu einer Erhöhung des systemischen Blutdrucks (Ardaillou 1999). Des Weiteren wird über die Aktivierung von AT₁-Rezeptoren die Sekretion des antidiuretischen Hormons (ADH) aus der Neurohypophyse ins Blutplasma stimuliert (Zini *et al.* 1996). Durch die Wirkung von ADH an V2-Rezeptoren kommt es an renalen Sammelrohrzellen zu einem vermehrten luminalen Einbau von Aquaporin 2 (AQP 2) und hierdurch zu einer gesteigerten Wasserrückresorption (Inoue *et al.* 2001). Über V1a-Rezeptoren an vaskulären Glattmuskelzellen wird eine Vasokonstriktion erreicht, über V1b-Rezeptoren eine erhöhte Freisetzung von ACTH (adrenocorticotropes Hormon) aus der Adenohypophyse (Share 1988; Sugimoto *et al.* 1994). Über membrangebundene AT₁-Rezeptoren auf Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde wird durch ANG II die Sekretion von Aldosteron stimuliert (Balla *et al.* 1991). Außerdem wird Aldosteron, ein aus Cholesterin gebildetes Steroidhormon, bei Hyperkaliämie, Hyponatriämie und unter Einfluss von ACTH vermehrt sezerniert (Lumbers 1999). Vermittelt über einen intrazellulär vorkommenden Mineralocorticoidrezeptor bewirkt Aldosteron eine erhöhte tubuläre Na⁺-Resorption durch Neusynthese und vermehrten luminalen Einbau von epithelialen Na⁺-Kanälen (ENaC) im distalen Nephron (Soundararajan *et al.* 2012). Basolateral werden Na⁺/K⁺-ATPasen und K⁺-Kanäle (ROMK) in die Zellmembran eingefügt (Schmidt 2010). Die gesteigerte Natriumresorption bewirkt eine osmotische Wasserretention und folglich eine Steigerung des intravasalen Volumens. Ein weiterer Effekt von ANG II ist die Induktion eines Durstgefühles und eines gesteigerten Salzappetits im zentralen Nervensystem (Fitzsimons 1998).

Eine Aktivierung des RAS resultiert folglich über die Induktion unterschiedlicher Signal- und Stoffwechselwege in der Erhöhung des systemischen Blutdrucks und des zirkulierenden intravasalen Volumens. Renin fungiert im Sinne einer Substratlimitierung als der geschwindigkeitsbestimmende Faktor des RAS, da ACE und Angiotensinogen in ausreichender Menge vorhanden sind (Kurtz 1989; Peters & Clausmeyer 2002). Über die gesteigerte Natriumretention sowie die damit verbundene systemische Blutdruckerhöhung

Aus medizinischer Sicht stehen verschiedene Inhibitoren des RAS zur Verfügung, die zur Behandlung von essentieller Hypertonie, Herzinsuffizienz und diabetischer Nephropathie eingesetzt werden können. Diese Hemmstoffe werden in vier Gruppen eingeteilt: Renin-Inhibitoren, ACE-Hemmer, AT₁-Rezeptorantagonisten und Aldosteronantagonisten.



2.3 Renin

2.3.1 Reninexpression im embryonalen und adulten Organismus

Während der Embryonalentwicklung der Maus findet sich erstmals an Tag 14 eine Reninexpression im Bereich des undifferenzierten Blastems des Metanephros (Sequeira Lopez *et al.* 2001). Reninexprimierende Zellen stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab und können sich zu Mesangialzellen und zu glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren. Die mesenchymalen Vorläuferzellen der Reninzellen exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxd1. Des Weiteren entwickeln sich aus diesen mesenchymalen Vorläuferzellen direkt glatte Gefäßmuskelzellen, interstitielle und wandständige Perizyten sowie Fibroblasten der Adventitia (Humphreys *et al.* 2010; Sequeira Lopez & Gomez 2011). Außerdem sind Perizyten während der Fetal- und frühen Postnatalperiode ebenfalls in der Lage Renin zu exprimieren (Berg *et al.* 2013). Reninzellen fungieren wie Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen als murale Zellen im präglomerulären arteriellen Gefäßsystem (Armulik *et al.* 2005; Sauter *et al.* 2008).

Während der Nephrogenese ist die Expression von Komponenten des RAS, vor allem von Renin, im Vergleich zum adulten Organismus deutlich erhöht und trägt zu einer physiologischen Nierenentwicklung bei (Gomez *et al.* 1989; Gomez & Norwood 1995; Schutz *et al.* 1996; Yosipiv & el-Dahr 1996; Hilgers *et al.* 1997; Guron & Friberg 2000). Eine Inhibition embryonaler reninsynthetisierender Zellen ruft renale Entwicklungsstörungen wie verkleinerte Nieren, atrophische und dilatierte Tubuli sowie atrophische und hyperplastische Glomeruli hervor. Außerdem finden sich in der Umgebung von diesen atrophischen Glomeruli und Tubuli undifferenzierte Zellen. Durchmesser und Gefäßwanddicke der renalen Gefäße zeigen keine Veränderungen (Pentz *et al.* 2004).

In der sich entwickelnden Niere treten an Tag 15 erstmals reninexprimierende Zellen auf, die mit α SMA (α smooth muscle actin) kolokalisiert sind und sich in den Aa. arcuatae befinden. Zunächst findet man reninpositive Zellen in den größeren arteriellen Gefäßen der Niere, während in den meisten der afferenten Arteriolen erst mit zunehmender Reifung des Embryos reninexprimierende Zellen auftreten. Mit einer Verlagerung der Reninexpression von den proximalen Anteilen des präglomerulären Gefäßbaums über distale Anteile bis hin zur

Lokalisation im Bereich des juxtaglomerulären Apparats (JGA) im Adultstadium geht ein sukzessives Abschalten der Reninexpression und -synthese in den größeren renalen Gefäßen einher (Gomez *et al.* 1989; Sauter *et al.* 2008). An Verzweigungsstellen von Gefäßen wurde unmittelbar vor der Entwicklung eines neuen Gefäßbaumastes eine erhöhte Anzahl an reninexprimierenden Zellen beobachtet. Deshalb wurde postuliert, dass Renin für die Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, was in anderen Studien allerdings nicht bestätigt werden konnte und für ein speziesspezifisches Phänomen gehalten wird (Reddi *et al.* 1998; Sauter *et al.* 2008).

Im adulten Organismus ist die Anzahl reninproduzierender Zellen nicht immer konstant. Bei chronischer Suppression von Renin durch Hypertension, renale Denervation, unter Hochsalzdiät und mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl von reninproduzierenden Zellen (Zhang *et al.* 1992; Holmer *et al.* 1993; Kurtz & Wagner 1998). Bei chronischer Stimulation des RAS, z.B. durch ACE-Inhibition, Hypotension, Dehydrierung, Salzdepletion und Nierenarterienstenose, können bestimmte glatte Gefäßmuskelzellen und Mesangialzellen wieder zur Reninsynthese angeregt werden (Gomez *et al.* 1988; Kim *et al.* 1999; Fuchs *et al.* 2002; Sequeira Lopez *et al.* 2004). Diese retrograd erfolgende Rekrutierung reninexprimierender Zellen zeigt ein diskontinuierliches band- beziehungsweise streifenförmiges Muster und breitet sich, ausgehend von den afferenten Arteriolen, bis zu den interlobularen Arterien und der A. renalis hin aus (Gomez *et al.* 1988; Fuchs *et al.* 2002).

Epitheloide JG-Zellen, extraglomeruläre Mesangialzellen, Macula densa-Zellen des distalen Tubulus und vaskuläre Glattmuskelzellen bilden gemeinsam den juxtaglomerulären Apparat (Taugner *et al.* 1984). In der adulten Niere wird Renin hauptsächlich von epitheloiden JG-Zellen produziert, welche in der Tunica media des Vas afferens in unmittelbarer Nähe des vaskulären Pols des Glomerulus liegen, dort glatte Gefäßmuskelzellen ersetzen und ihre typische kubische Form durch zahlreiche Reninspeichergranula erhalten (Barajas 1979; Taugner *et al.* 1984). JG-Zellen, welche als Teil der Gefäßwand fungieren, exprimieren kein Glattmuskelaktin (Sauter *et al.* 2008). In geringen Mengen wird Renin auch speziesspezifisch von Zellen des extraglomerulären Mesangiums und der Tunica media der efferenten Arteriole gebildet (Kon 1999).

2.3.2 Reninsynthese und -sekretion

Renin wird beim Menschen und dem C57/BI6-Mausstamm durch ein auf Chromosom 1 lokalisiertes Gen (Ren-1C) kodiert (Chirgwin *et al.* 1984a; Chirgwin *et al.* 1984b). Dahingegen sind bei allen anderen Mausstämmen zwei Reningene (Ren-1D und Ren-2) auf Chromosom 1 vorhanden, deren Entstehung einer Genduplikation vor circa drei Millionen Jahren zugeschrieben wird (Dickinson *et al.* 1984; Holm *et al.* 1984; Field & Gross 1985). Bei Mäusen bestehen die Reningene aus neun Exons und acht Introns, beim Menschen kommt ein weiteres Exon (Exon 5A) hinzu, das für drei zusätzliche Aminosäuren kodiert. Insgesamt ergeben sich große Übereinstimmungen zwischen den einzelnen Arten (Castrop *et al.* 2010).

Zu Beginn der Reninsynthese erfolgen Transkription und Translation. Anschließend wird das entstandene Prä-Prorenin in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo durch Abspaltung der Signalsequenz das enzymatisch inaktive Prorenin entsteht und sich der Weitertransport zum Golgi-Apparat anschließt. Aus dem Golgi-Apparat wird das Hormon entweder konstitutiv in kleinen, klaren Vesikeln als Prorenin sezerniert oder durch Glykosylierung mit Mannose-6-Phosphat-Resten versehen und in lysosomenartigen Dense-Core-Vesikeln gespeichert, wo es durch Abspaltung von 46 N-terminalen Aminosäuren in die aktive Form überführt werden kann. Anschließend gelangen die Speichervesikel unter die Zellmembran und können über einen regulierten Exozytosemechanismus als aktives Renin sezerniert werden (Friis *et al.* 2000; Schweda *et al.* 2007). Bei Stimulation der Reninsekretion kommt es zu einer intrazellulären Fusion von reninhaltigen Vesikeln zu größeren Kavernen mit anschließender Exozytose. Die Reninausschüttung erfolgt durch die sogenannte Compound-Exozytose. Hierbei interagieren die sekretorischen Vesikel während der Fusion mit der Plasmamembran untereinander. Die Vesikel sind für das typische kuboide, granulierte Aussehen reninproduzierender Zellen verantwortlich (Pickett & Edwardson 2006; Stepan *et al.* 2012).

Die regulierte Exozytose von Renin wird durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels ausgelöst (Friis *et al.* 2000; Klar *et al.* 2002). Weitere wichtige regulatorische, in die Reninsekretion eingreifende second messenger sind Ca^{2+} und cGMP. Ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg in der JG-Zelle, wie beispielsweise durch ANG II vermittelt, ist für eine verminderte Reninfreisetzung verantwortlich, durch niedrige zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wird die Reninsekretion wiederum gesteigert. Dieser Mechanismus wird als Ca^{2+} -Paradoxon

bezeichnet (van Dongen & Peart 1974; Ichihara *et al.* 1995; Ortiz-Capisano *et al.* 2007). Der suppressive Effekt eines intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs auf die Reninsekretion wird über die von Calcium vermittelte Inhibition der Adenylatcyclasen AC5 sowie AC6 reguliert (Grünberger *et al.* 2006). Das Signalmolekül cGMP kann die Reninsekretion sowohl, wie bei niedriger zytosolischer Konzentration beobachtet, fördern, als auch bei höherer intrazellulärer Konzentration inhibieren (Gambaryan *et al.* 1998; Kurtz & Wagner 1998; Wagner *et al.* 1998).

2.3.3 Regulation der Reninsynthese und -sekretion

2.3.3.1 Nierenperfusion und systemischer Blutdruck

Die Regulation der Reninsynthese und -sekretion erfolgt u.a. über den arteriellen Nierenperfusionsdruck, wobei bei renaler Minderdurchblutung die Reninsekretion gesteigert wird (Skinner *et al.* 1963; Nafz *et al.* 1997). Einem verminderten Nierenperfusionsdruck können eine systemische Blutdrucksenkung, lokale vasokonstriktorische Reaktionen, Hypovolämie und/oder pathologische Veränderungen der Nierengefäße, beispielsweise eine Stenose der A. renalis, zu Grunde liegen (Schmidt 2010). Bei einem gesteigerten systemischen Blutdruck kommt es hingegen zu einer Senkung der Reninsekretionsrate (Wagner & Kurtz 1998). Die Existenz eines renalen Barorezeptors wurde postuliert, da an isoliert perfundierten Nieren und isolierten JG-Zellen nachgewiesen werden konnte, dass die Reninsekretionsrate abhängig von der Perfusion ist (Bock *et al.* 1992; Scholz & Kurtz 1993; Carey *et al.* 1997; Ryan *et al.* 2000).

2.3.3.2 Salzhaushalt

Eng verknüpft mit systemischem Blutdruck und renaler Perfusion ist der Salzhaushalt des Körpers. Bei adulten Ratten, die unter Niedrigsalzdiät gehalten werden, ist ein erhöhter Plasmapreninspiegel festzustellen, unter Hochsalzdiät eine verminderte Reninsekretion (Holmer *et al.* 1993). Zu den Stimuli für eine Freisetzung von Renin aus Vesikeln der JG-Zelle zählt man eine geringe tubuläre NaCl-Konzentration, welche an tubulären Zellen der

Macula densa registriert wird (Skott & Briggs 1987; Lorenz *et al.* 1991). Diese Zellen sind in unmittelbarer Nähe der reninexprimierenden Zellen der afferenten Arteriole lokalisiert, bilden einen Teil des distalen Tubulus und exprimieren apikal einen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transporter (NKCC2) (Taugner *et al.* 1984; Lapointe *et al.* 1990; Bell & Lapointe 1997). Durch eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriole wird bei hoher tubulärer NaCl-Konzentration ein verminderter renaler Blutfluss sowie folglich eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate erreicht, und umgekehrt (Schnermann & Levine 2003). Der MD-Mechanismus ist vor allem bei akuten, weniger bei chronischen, Änderungen der tubulären NaCl-Konzentration relevant für die Reninsekretion (Castrop 2007). Dieser tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus führt bei niedriger tubulärer NaCl-Konzentration direkt zu einem Anstieg der Reninsekretion, eine hohe NaCl-Konzentration hingegen hemmt diese (Skott & Briggs 1987; Schnermann 1998; Castrop 2007). Welche Faktoren in längerfristiger Hinsicht die salzabhängige Reninausschüttung regulieren ist nicht bekannt (Castrop *et al.* 2010).

2.3.3.3 Sympathisches Nervensystem

Das sympathische Nervensystem nimmt über verschiedene Mechanismen vor allem auf die basale Reninsekretion und -synthese Einfluss (Castrop *et al.* 2010). So können JG-Zellen durch eine β_1 -adrenerge sympathische Stimulation und einen erhöhten Katecholaminspiegel im Blutplasma über einen intrazellulären cAMP-Anstieg zu einer gesteigerten Reninsekretion angeregt werden (Vandongen *et al.* 1973; Bergsten *et al.* 2001; Boivin *et al.* 2001; DiBona & Kopp 1997). Renale Denervation und Inhibition der β -Adrenorezeptoren führen zu verminderter Stimulation der Reninexpression (Keeton & Campbell 1980; Holmer *et al.* 1994). Bei β_1 - und β_2 -Adrenorezeptor-Knockoutmäusen ist die Plasmapreninkonzentration im Vergleich zum Wildtyp um ca. 85 % vermindert (Kim *et al.* 2007).

Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass das sympathische Nervensystem durch die Aktivierung von intrarenalen α_1 -Adrenorezeptoren eine Steigerung des Blutdrucks mit konsekutiv erhöhter Reninausschüttung bewirkt (Ehmke *et al.* 1989). Juxtaglomeruläre Zellen können über die Aktivierung von α_1 - oder α_2 -Adrenorezeptoren nicht direkt zur Reninsekretion angeregt werden (Hesse & Johns 1985). Bei Versuchstieren unter Nidrigsalzdiät ist die sympathische Aktivität in der Niere signifikant höher als bei solchen unter Hochsalzdiät (Carillo *et al.* 2007).

2.3.3.4 Weitere Einflussfaktoren auf Reninsynthese und -sekretion

Es wurden zahlreiche weitere Einflussfaktoren auf die Reninsynthese und -sekretion beschrieben. Eine Stimulation der Reninsynthese und/oder -sekretion bewirken Dopamin, Glukagon, Aldosteron, Adrenomedullin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), Parathormon, Prostaglandine (PGI₂ und PGE₂) und VIP (vasoaktives intestinales Peptid) sowie die Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodtyronin (Hauger-Klevene *et al.* 1977; Keeton & Campbell 1980; Porter *et al.* 1982; Kurtz *et al.* 1988; Gnaedinger *et al.* 1989; Marchant *et al.* 1993; Saussine *et al.* 1993; Jensen *et al.* 1997; Klar *et al.* 2004). Inhibierend auf die Reninkonzentration im Plasma wirken Endothelin, TNF α (tumor necrosis factor α), ANP (atrialess natriuretisches Peptid), IL-1 und -6 (Interleukin-1 und -6) sowie PAF (platelet activating factor) (Pfeilschifter *et al.* 1985; Kurtz 1986; Kurtz *et al.* 1991; Jensen *et al.* 1998; Pan *et al.* 2005b; Todorov *et al.* 2002).

2.4 Platelet derived growth factor (PDGF)

Der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) wurde vor etwa 40 Jahren erstmals als ein von Thrombozyten produzierter Faktor beschrieben, welcher die Proliferation glatter Muskelzellen stimuliert (Ross *et al.* 1974; Kaplan *et al.* 1979; Linder *et al.* 1979). Seitdem wurden zahlreiche weitere Funktionen dieses Wachstumsfaktors erforscht.

2.4.1 Isoformen der PDGF-Familie

Die PDGF-Familie setzt sich zusammen aus den Monomeren PDGF-A, -B, -C und -D, die über je zwei Disulfidbrücken zu den fünf bislang beschriebenen kationischen Homo- und Heterodimeren PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD verbunden werden (Heldin & Westermark 1999; Fredriksson *et al.* 2004). Die Gene für PDGF-A und -B liegen auf den Chromosomen 7 beziehungsweise 22 (Dalla-Favera *et al.* 1982; Doolittle *et al.* 1983; Betsholtz *et al.* 1986). Zwischen den aus je etwa 100 Aminosäuren bestehenden Polypeptidketten PDGF-A und -B liegt eine ca. 50%ige Übereinstimmung der

Aminosäuresequenz vor (Heldin & Westermark 1999; Fredriksson *et al.* 2004). Durch drei intramolekulare Disulfidbrücken entsteht aus der Polypeptidkette ein „cystine knot“-Motiv, welches die sogenannte PDGF/VEGF-Homologiedomäne charakterisiert (Murray-Rust *et al.* 1993; Fredriksson *et al.* 2004). Es bestehen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zwischen den beiden Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF (Salven *et al.* 1998). Die beiden Untereinheiten eines PDGF-Dimers werden durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (Haniu *et al.* 1993; Haniu *et al.* 1994). Durch proteolytische Modifizierung am N-Terminus (A- und B-Kette) und am C-Terminus (B-Kette) entstehen intrazellulär aus Vorläufermolekülen PDGF-A und PDGF-B. Die Sekretion der aktiven Formen PDGF-AA, -AB und -BB erfolgt via Exozytose (Ostman *et al.* 1992).

Neben den klassischen PDGF-Liganden -A und -B sind seit einigen Jahren zwei weitere PDGF-Liganden (PDGF-CC und -DD) bekannt, deren Gene auf den Chromosomen 4 und 11 lokalisiert sind (Li *et al.* 2000; LaRoche *et al.* 2001; Uutela *et al.* 2001; Dijkmans *et al.* 2002). Diese beiden PDGF-Isoformen werden inaktiv sezerniert und durch limitierte Proteolyse der CUB-Domäne (= complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1) mittels extrazellulärer Proteasen aktiviert (Bergsten *et al.* 2001; Dijkmans *et al.* 2002; Fredriksson *et al.* 2004).

2.4.2 PDGF-Rezeptoren und Signaltransduktion

PDGF aktiviert als ein Signalmolekül aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren einen Rezeptor vom Tyrosinkinasetyp (Ek *et al.* 1982). Die beiden PDGF-Rezeptor-Isoformen α und β bestehen aus je fünf extrazellulären immunglobulinartigen Domänen am N-Terminus und einer zytosolischen Tyrosinkinasedomäne mit intrinsischer Aktivität am C-Terminus, die über eine Transmembrandomäne verbunden sind (Yarden *et al.* 1986; Claesson-Welsh *et al.* 1989; Matsui *et al.* 1989;). Das Gen für PDGFR- α liegt auf Chromosom 4, der kodierende Abschnitt für PDGFR- β ist auf Chromosom 5 lokalisiert (Yarden *et al.* 1986; Spritz *et al.* 1994). Die PDGF-Rezeptoren liegen immer als homo- beziehungsweise heterodimere Rezeptorkomplexe vor (Bishayee *et al.* 1989; Heldin *et al.* 1989; Heldin & Westermark 1999). Die PDGF-Liganden weisen ein unterschiedliches Bindungsmuster an die PDGF-Rezeptoren auf: So binden an PDGFR- α alle bekannten PDGF-Isotypen außer PDGF-DD und an den heterodimeren PDGFR- $\alpha\beta$ -Komplex PDGF-BB, -AB und -CC. PDGF-BB und -DD wirken an PDGFR- β , wobei hier der erstgenannte Ligand derjenige mit der höchsten Affinität ist (Seifert

et al. 1989; Li *et al.* 2000; Bergsten *et al.* 2001). Zudem wird eine Aktivierung von PDGFR- $\alpha\beta$ durch PDGF-DD postuliert (siehe Abbildung 2) (LaRochelle *et al.* 2001).

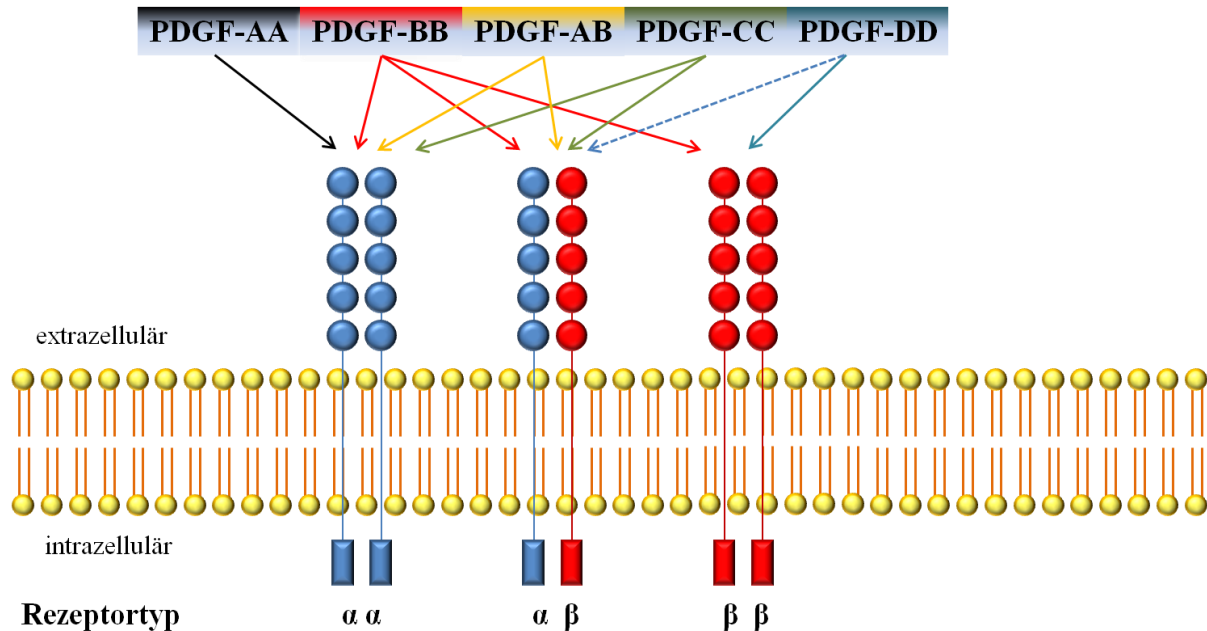


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Bindungsmusters der PDGF-Liganden an die PDGF-Rezeptoren. Durchgezogene Pfeile stellen die Fähigkeit der fünf PDGF-Liganden dar, die homo- beziehungsweise heterodimeren Rezeptorkomplexe zu aktivieren. Der gestrichelte Pfeil zeigt eine postulierte Bindung an. Modifiziert nach Fredriksson *et al.* 2004.

Als dimere Moleküle binden die PDGF-Isoformen an zwei Rezeptoren gleichzeitig und rufen so eine durch Liganden induzierte Rezeptordimerisierung hervor (Bishayee *et al.* 1989; Heldin *et al.* 1989; Heldin & Westermark 1999). Die durch die Rezeptordimerisierung ermöglichte Auto- und Kreuzphosphorylierung von Tyrosinresten an der zytosolischen Domäne des Rezeptors bewirkt die Entstehung von Bindungsstellen für Signaltransduktionsmoleküle mit SH2-Domänen, wie beispielsweise PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), PLC γ (Phospholipase C γ), Src, MAP-Kinase (mitogen-activated protein-Kinase), GAP (GTPase activating protein) und Grb2/Sos (Kazlauskas & Cooper 1990; Kazlauskas *et al.* 1991; Langan *et al.* 1994; Gelderloos *et al.* 1998; Emaduddin *et al.* 1999; Schlesinger *et al.* 1999; Tallquist & Kazlauskas 2004). Über diese Signaltransduktionsmoleküle werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt. Die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors bewirkt eine erhöhte katalytische Effizienz der Kinasen (Fantl *et al.* 1989; Kazlauskas & Cooper 1989). Die beiden PDGF-Rezeptortypen bewirken intrazellulär

sich überlappende, aber nicht identische Mechanismen und Signale und unterscheiden sich in ihrem Expressionsmuster (Heldin & Westermark 1999).

2.4.3 Expression von PDGF-Rezeptoren und -Liganden

Ursprünglich wurden Thrombozyten als Produzenten von PDGF identifiziert (Ross *et al.* 1974; Kaplan *et al.* 1979; Linder *et al.* 1979). Heutzutage ist bekannt, dass die PDGF-Liganden von vielen unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert werden. Für diese Arbeit ist besonders die Produktion von PDGF durch renale Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Mesangialzellen relevant (DiCorleto & Bowen-Pope 1983; Nilsson *et al.* 1985b, 1985a; Seifert *et al.* 1984; Abboud *et al.* 1987). In der Zeit der Embryonalentwicklung erfolgt die Synthese von PDGF-BB durch endotheliale Zellen aussprossender Gefäße, während PDGFR- β von Zellen mesenchymalen Ursprungs, vor allem von Perizyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Mesangialzellen exprimiert wird (Alpers *et al.* 1992; Sundberg *et al.* 1993; Lindahl *et al.* 1997; Hellström *et al.* 1999). Zu PDGFR- α -exprimierenden Zellen zählen unter anderem glatte Gefäßmuskelzellen und mesenchymale Zellen, deren Lokalisation ohne spezifische Assoziation mit sich entwickelnden Gefäßen beschrieben wurde (Lindahl *et al.* 1997; Heldin & Westermark 1999).

2.4.4 Physiologische Funktionen von PDGF

PDGF bewirkt als wichtiger mitogener Wachstumsfaktor bei Zellen mesenchymalen Ursprungs, beispielsweise bei glatten Muskelzellen und Fibroblasten, sowie bei Zellen neuroektodermaler Herkunft wie Oligodendrozyten eine Stimulation der Proliferation und Migration (Westermark *et al.* 1990; Heldin & Westermark 1999; Fredriksson *et al.* 2004). PDGF-BB übt eine mitogene und chemotaktische Wirkung auf Mesangialzellen aus, welche hierdurch außerdem vermehrt zur Produktion extrazellulärer Matrix und Kontraktion angeregt werden (Mene *et al.* 1987; Shultz *et al.* 1988; Barnes & Hevey 1990; Doi *et al.* 1992). Die Vermittlung der Chemotaxis erfolgt sowohl über α - als auch über β -Rezeptoren, wobei über eine Aktivierung von α -Rezeptoren bei manchen Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten und glatten Muskelzellen, die chemotaktische Wirkung auch inhibiert werden kann (Hosang

et al. 1989; Siegbahn *et al.* 1990; Shure *et al.* 1992; Yokote *et al.* 1996; Heldin & Westermark 1999). Des Weiteren löst PDGF-BB angiogenetische und antiapoptotische Effekte sowie eine Reorganisation von Aktinfilamenten aus (Eriksson *et al.* 1992; Risau *et al.* 1992; Battegay *et al.* 1994; Nicosia *et al.* 1994; Yao & Cooper 1995). Ferner ist PDGF relevant für die Wundheilung im adulten Organismus sowie für embryonale Entwicklungsprozesse von ZNS, Lunge, Niere und Gefäßsystem (Fruttiger *et al.* 1999; Heldin & Westermark 1999).

Die Synthese von PDGF wird gesteigert durch erhöhte Stimulation mit einigen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, niedrigen Sauerstoffpartialdruck und Thrombin (Harlan *et al.* 1986; Kourembanas *et al.* 1997; Heldin & Westermark 1999). Die Expression des PDGF-Rezeptors wird durch inflammatorische Prozesse hochreguliert (Fellstrom *et al.* 1989).

Besonders relevant ist der PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg für physiologische Prozesse in der Niere. So erfolgt bei der renalen Vaskulogenese ein Zusammenspiel zwischen endothelialen Zellen, die PDGF-BB als chemotaktisches Signal sezernieren, und Perizyten, welche durch dieses Signal über ihren PDGF- β -Rezeptor zu sich entwickelnden Gefäßröhren gelockt werden und sich an diese anlagern (Sundberg *et al.* 1993; Hellstrom *et al.* 2001; Gerhardt & Betsholtz 2003; Lindblom *et al.* 2003). Der PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg ist für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen mesenchymalen Ursprungs äußerst relevant (Heldin & Westermark 1999). Die Entwicklung von muralen Zellen wie Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen sowie von Mesangialzellen hängt stark mit diesem Signalweg zusammen (Soriano 1994; Lindahl *et al.* 1997; Enge *et al.* 2002). Bei Knockouts von PDGF-BB oder PDGFR- β kommt es zu multiplen Störungen der vaskulären und renalen Entwicklung (siehe 2.4.5.2).

2.4.5 Beteiligung von PDGF bei pathologischen Prozessen

2.4.5.1 Beteiligung von PDGF bei pathologischen Prozessen in verschiedenen Organen

Bei unterschiedlichen pathologischen Prozessen wird in der Literatur eine Beteiligung von PDGF beschrieben. So sind bestimmte krankhafte Prozesse wie Lungen-, Leber- und Nierenfibrose sowie Sklerodermie mit einer gesteigerten Expression von PDGF-Liganden und -Rezeptoren assoziiert. Außerdem tritt bei einigen Tumoren, beispielsweise Glioblastomen

oder Sarkomen, eine auto- und/oder parakrine Sekretion dieses Wachstumsfaktors auf (Andrae *et al.* 2008).

Des Weiteren spielen PDGF-BB und PDGFR- β eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Entwicklungen im kardiovaskulären System. So sind beispielsweise vaskuläre Erkrankungen wie die Arteriosklerose durch eine vermehrte Expression von PDGF gekennzeichnet (Barrett & Benditt 1987; Raines 2004). Außerdem führt ein Knockout des PDGF-B-Proteins zu myokardialer Hypotrophie und Dilatation des Herzens mit reduzierter Wanddicke und verstärkter Trabekulierung (Levéen *et al.* 1994; Bjarnegard *et al.* 2004). Selektive Knockouts der PDGF-B-Kette im Endothel der Retina resultieren bei Mäusen mit verminderter Anzahl von Perizyten in ähnlichen Defekten - Mikroaneurysmen, unregelmäßige Durchmesser der Mikrogefäße und unregelmäßige Kapillardichte - wie sie auch bei einer diabetischen Retinopathie zu finden sind. Neben der Perizytenzahl ist bei diesen Versuchstieren auch die Anzahl an vaskulären Glattmuskelzellen reduziert (Enge *et al.* 2002). Auch in der Plazenta zeigen sich bei einem Knockout der PDGF-B-Kette dilatierte embryonale und maternale Gefäße sowie eine reduzierte Anzahl an Perizyten und Trophoblastenzellen (Ohlsson *et al.* 1999; Bjarnegard *et al.* 2004). Auf die Gefäßlänge und Anzahl der Gefäßaufzweigungen hat der Knockout von PDGF-B oder PDGFR- β aber keinen Einfluss (Hellstrom *et al.* 2001). Bei einem generellen Knockout des PDGF- β -Rezeptors kommt es ebenfalls zu multiplen Störungen wie einem Fehlen von Mesangialzellen, Anämie, Thrombozytopenie, Hämorrhagien und abnorm entwickelten Glomeruli ohne Kapillarknäuel (Soriano 1994).

2.4.5.2 Beteiligung von PDGF bei pathologischen Prozessen in der Niere

Eine komplette Inaktivierung der PDGF-B-Kette während der Nephrogenese ruft abnorm entwickelte Glomeruli mit nur einer oder wenigen aneurysmaartigen Kapillaren und generalisierten Ödemen hervor. Zudem treten schwere Hämorrhagien mit Erythroblastose, Anämie sowie Thrombozytopenie auf, welche u.a. verantwortlich für den perinatalen Tod der Versuchstiere sind (Levéen *et al.* 1994; Lindahl *et al.* 1997). Außerdem ist die Anzahl von Mesangialzellen im Glomerulus vermindert, das Herz und einige große Arterien dilatieren in späten Embryonalstadien (Levéen *et al.* 1994). Endotheliale Zellen sind nicht mehr in der Lage, Progenitorzellen von Perizyten zu sich in der Entwicklung befindlichen Gefäßen hin zu

rekrutieren (Lindahl *et al.* 1997; Ohlsson *et al.* 1999; Lindblom *et al.* 2003). Das Fehlen von Perizyten in PDGF-BB/-R β -defizienten Mäusen induziert endotheliale Hyperplasie, Mikroaneurysmen und durchschnittlich um 25% vergrößerte sowie variablere kapilläre Diameter (Hellstrom *et al.* 2001). Ein selektiver PDGF-BB-Knockout in endothelialen Zellen führt in der Embryonalperiode zu einem Fehlen von mesangialen Zellen, einer Erweiterung der Durchmesser der Glomeruli sowie einem Ballooning des glomerulären Kapillarnetzes. Drei Wochen postnatal entspricht die Anzahl mesangialer Zellen wieder annähernd dem Normalzustand, auch wenn der Kapillardurchmesser weiterhin erhöht ist (Bjarnegard *et al.* 2004).

Die Expression von PDGF ist bei vielen renalen Erkrankungen und pathologischen Prozessen in der Niere, wie z.B. mesangioproliferativer Glomerulonephritis, nephrotoxischer Nephritis, diabetischer Nephropathie, Nierentransplantation, Lupusnephritis, renaler Ischämie und Reperfusion sowie IgA-Nephropathie gesteigert (Floege *et al.* 2008).

2.5 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Der Vorgang, durch den Reninzellen während der Embryonalperiode aus dem mesenchymalen Gewebe zur Gefäßwand gelangen und dort in diese integriert werden, wurde noch nicht beschrieben. Des Weiteren ist unklar welche Faktoren die Rekrutierung von reninproduzierenden Zellen aus dem Mesenchym zu den Gefäßwänden hin induzieren und begünstigen. Reninzellen bilden einen Teil der Gefäßwand und zählen wie glatte Muskelzellen und Perizyten zu den muralen Zellen. Es ist bekannt, dass sich bei der Neubildung renaler Gefäße zunächst Endothelzellen unter dem Einfluss von VEGF zu einfachen Gefäßtuben zusammenschließen, um welche sich dann eine stabile Wand von außen aufbaut. Nach dem heutigen Verständnis werden dazu Perizyten als murale Zellbestandteile rekrutiert, wobei Endothelzellen als chemotaktisches Signal PDGF-BB sezernieren und damit Perizyten anlocken. Die renalen Perizyten besitzen hierzu elementar PDGF- β -Rezeptoren. Perizyten gelten in der Niere nicht nur als Vorläufer von Gefäßmuskelzellen, sondern auch von mesangialen Zellen. Unter der Annahme, dass sich Reninzellen als murale Zellen eigentlich von Perizyten ableiten, wurde folgendes Arbeitsmodell entwickelt: Bei der Ausbildung des renalen Gefäßbaums werden Perizyten über Sekretion von PDGF-BB des neu gebildeten Endothels angelockt. Da diese über eine große Plastizität verfügen, differenzieren sie sich dabei auch in murale Zellen, welche beginnen Renin zu exprimieren. Um diesen hypothetischen Ansatz zu untersuchen wurde ein konditionales Modell verwendet, bei welchem selektiv in Endothelzellen die Synthese des PDGF-B-Proteins ausgeschaltet wurde. Da PDGF-BB während der renalen Gefäßentwicklung vor allem von Endothelzellen synthetisiert wird, wurden Mäuse mit Hilfe des Cre-loxP-Systems unter der Verwendung von Tie-2 als Promotor generiert. Tie-2 ist eine Rezeptortyrosinkinase, die fast ausschließlich von endothelialen Zellen exprimiert wird und sich deswegen für einen spezifischen Knockout von PDGF-BB in diesen Zellen eignet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets	
TRITC-Filter: Anregung 533-558 nm Emission 570-640 nm	Filter set 43, Zeiss, Jena
Cy2-Filter: Anregung 450-490 nm Emission 500-550 nm	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Cy5-Filter: Anregung 625-655 nm Emission 665-715 nm	Filter set 50, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific

Gerät	Hersteller
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore, Schwalbach
PCR-Geräte	Light Cycler 480, Roche, Mannheim
Photometer	BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000 Gilson, Middleton, USA
Scantisch	motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM 25, Edmund Bühler, Hechingen
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/1
Wasserbäder	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Erlenmeyer Kolben	Duran, Mainz
Filter	Schleicher&Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Science Services, München
Niedrigsalzfutter 0,02 % NaCl	Ssniff, Soest
Normalsalzfutter 0,6 % NaCl	Ssniff, Soest
Objektträger	SuperFrost®Plus, Menzel, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Sarstedt, Nümbrecht
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm

Produkt	Hersteller
DNA Längenstandard: 100 bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Enalapril	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako North America, Carpinteria, USA
Heparin Liquemin [®] 25000 5 ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
HCl 1N	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/μl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Oligo(dT)15 Primer, 0,5 μg/μl	Promega, Mannheim
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM)	Promega, Freiburg
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
SYBR [®] Green Master Kit	Roche, Mannheim
TRIzol [®] -Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.4 Primer

Die Primer für die Genotypisierung wurden in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert (Biomers.net, Ulm). Eine Konzentration von 100 pmol/μl wurde durch Zugabe von nukleasefreien Wasser erreicht.

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
chicken anti-Renin IgG	polyklonal	Davids Biotechnologie, Regensburg	1:400
mouse anti-αSMA IgG	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:600

Sekundärantikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
donkey anti-chicken IgG	Rhodamin (TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
donkey anti-mouse-IgG	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400

3.1.6 Lösungen und Puffer

Sofern nicht andernorts vermerkt, wurden die Chemikalien für alle Lösungen und Puffer in H₂O_{bidest} gelöst.

Phosphate Buffered Saline (PBS)-Puffer, pH 7,4	
NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Perfusionslösung zur Fixierung von Gewebe	
PBS	
Paraformaldehyd	3 %

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %

Blockierlösung	
PBS-Otto-Puffer	
BSA	1 %
HS	10 %

Agarosegel	
TAE	
Agarose	1,5 %

Tris-HCl für gDNA-Extraktion	
Tris-HCl	1 M, pH 8

10x TAE (Tris-Acetat-EDTA) Puffer	
Tris Base	0,4 M
Essigsäure	0,2 M
EDTA	10 mM

NaOH für gDNA-Extraktion	
NaOH	25 mM

DEPC-H₂O	
DEPC in H ₂ O	1/1000 V
Schütteln und über Nacht unter Abzug stehen lassen, anschließend autoklavieren	

3.1.7 Software und Internetdienste

Diese Doktorarbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office* (*Microsoft Office Excel, PowerPoint und Word*) 2007 verfasst. Zur Literaturrecherche wurden *PubMed* des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und zur Literaturverwaltung *Citavi 3* (Swiss Academic Software, Schweiz) verwendet. Die Graphen wurden mit Hilfe von *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere dieser Arbeit stammten aus einer Züchtung zwischen Mäusen mit einem geflochten PDGF-B-Gen und solchen mit Tie-2 abhängiger Expression der Cre-Rekombinase (Kisanuki *et al.* 2001; Enge *et al.* 2002). Als Kontrolltiere dienten Tiere ohne Cre-Rekombinase (Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}). Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch den Nachweis von Tie-2^{+Cre} in der PCR mittels aus dem Schwanz entnommenen Biopsaten. Die für Nagetiere optimalen Haltungsbedingungen wurden eingehalten (freier Zugang zu

Trinkwasser und Futter, Raumtemperatur $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\text{ } \% \pm 5\text{ } \%$, Hell-Dunkelintervall 12 Stunden).

Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Knockout-Mäuse und Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäuse als entsprechende Kontrolltiere wurden in zwei Gruppen (jeweils n = 5) aufgeteilt. Ein Teil der Versuchstiere wurde 10 Tage lang ausschließlich mit Niedrigsalzfutter (0,02 % w/w NaCl) ernährt, der andere Teil erhielt Standardfutter (0,6 % w/w NaCl). Bei der mit Niedrigsalzfutter ernährten Gruppe wurde zusätzlich am 6. Tag des Versuchs der ACE-Hemmer Enalapril (10 mg/kg Körpergewicht pro Tag) zum Trinkwasser der Tiere hinzugegeben, um das RAS und die Produktion von Renin anzuregen.

3.2.2 Retrograde arterielle Perfusion

Zur Gewinnung von Material für die anschließenden histologischen Färbungen der Niere wurden die Versuchstiere zunächst durch die intraperitoneale Gabe von Xylazin und Ketamin (80 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Im Anschluss erfolgte die Eröffnung des Abdomens sowie das Anbringen einer Klemme an der Aorta abdominalis distal des Abgangs der paarigen Aa. renales. Durch diese Maßnahme war die Hämoperfusion der Nieren weiterhin gewährleistet. Etwas weiter distal der Klemme wurde ein Perfusionskatheter mit Hilfe einer Klammer an der Aorta befestigt. Um ein Abfließen der Perfusionslösung zu ermöglichen wurde die Vena cava inferior durch einen Schnitt eröffnet. Anschließend erfolgte die Entfernung der weiter proximal gelegenen Klammer. Mit Hilfe des Perfusionskatheters wurden 10 ml isotone NaCl-Lösung sowie 10 I.E./ml Heparin retrograd perfundiert. Eine gelungene Perfusion führte zu einer raschen Entfärbung der Abdominalorgane. Danach wurden die Nieren mit konstantem Fluss (40 ml/3 min) mit 3 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Jeweils eine Niere einer Maus wurde, nach Schockfrost mit N₂, zur späteren RNA-Isolierung bei -80 °C sowie die andere Niere des Tieres bei 4 °C in 70 % Methanol gelagert.

3.2.3 Paraffinschnitte

Bei der Paraffineinbettung wurden die entnommenen Organe in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgendermaßen entwässert: je 2x 30 Minuten in 70 % Methanol bei Raumtemperatur (RT), je 2x 30 Minuten in 80 % Methanol bei RT, je 2x 30 Minuten in 90 % Methanol bei RT, je 2x 30 Minuten in absolutem Methanol bei RT, je 2x 30 Minuten in absolutem Isopropanol bei RT, 30 Minuten in Isopropanol bei 45 °C und 30 Minuten in einem Isopropanol-Paraffingemisch (1:1) bei 55 °C. Anschließend wurden die Nieren zweimal für je mindestens 24 Stunden in geschmolzenes Paraffin (60 °C) gegeben. Als letzter Schritt der Paraffineinbettung wurde das Gewebe in mit 60 °C warmem Paraffin befüllte Silikonkautschuk-Gießformen gegeben und einige Stunden zur Aushärtung bei RT belassen. Am Rotationsmikrotom wurden Schnitte der auf einem kleinen Holzblock befestigten Paraffinblöcke in einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt, im auf 40 °C erwärmten Wasserbad gestreckt und anschließend auf Objektträger übertragen. Im Wärmeschrank wurden die Objektträger bei einer Temperatur von 40 °C über Nacht getrocknet.

3.2.4 Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung

Die Immunhistochemie bezeichnet ein Verfahren, welches genutzt wird, um Proteine im Gewebe zu lokalisieren und deren Intensität mit Hilfe von Primär- sowie Sekundärantikörpern zu bestimmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper waren fluoreszierend. Die Mikrotomschnitte wurden beim Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe in Xylol (absolut, 2x 10 Minuten), Isopropanol (absolut, 2x 5 Minuten) und Isopropanol (96 %, 80 % und 70 %, je 5 Minuten) für die immunhistochemische Färbung vorbereitet. Direkt im Anschluss an das Entparaffinieren wurden die Schnitte dreimal für je 10 Minuten in PBS-Waschpuffer auf den Schüttler gegeben. Um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen wurden die Schnitte mit einer Blockierlösung aus 10 % Horse Serum in 1 % BSA/PBS 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Färbeschritt wurden die primären Antikörper aufgetragen, die mit 10 % Horse Serum in 1 % BSA/PBS verdünnt waren. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1 % BSA/PBS wurden die sekundären Antikörper, verdünnt

in 1 % BSA/PBS, auf die Schnitte gegeben und 90 Minuten lang inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für jeweils 10 Minuten.

3.2.5 Mikroskopie und Bilddigitalisierung

Die Paraffinschnitte der Niere wurden mit Hilfe des Axiovert 200M Mikroskops mit motorisierter Objektauflage und angeschlossener Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) betrachtet, aufgenommen und digitalisiert. Bei Serienschnitten wurde nach der Einstellung einer geeigneten Belichtungszeit für die einzelnen Kanäle und der Überprüfung der Einstellungen durch ein Testbild ein für die dreidimensionale Rekonstruktion des Gewebes geeigneter Bereich ausgewählt. Anschließend wurde für jeden Objektträger ein Übersichtsbild der einzelnen Nierenschnitte erzeugt. Anhand dieses Übersichtsbildes wurden die Serienschnitte in einer Mehrkanalaufnahme fotografiert. Abschließend erfolgte eine Bearbeitung der Bilder mittels Stitching in Bezug auf den Referenzkanal Aktin, um Überlappungen auszugleichen, sowie eine Konvertierung der Kachelbilder.

3.2.6 Dreidimensionale Rekonstruktion

3.2.6.1 Axiovision

Da für die folgende Bearbeitung der Daten eine Konvertierung auf 8 Bit nötig war, wurde das Grafikformat TIFF verwendet um einen Qualitätsverlust des Bildmaterials zu vermeiden:

- Öffnen eines beliebigen Bildes
- Datei → Exportieren → *.tif
- Stapelverarbeitung Start

3.2.6.2 ImageJ

Zur weiteren Datenverarbeitung diente das Grafikprogramm ImageJ (Wayne Rasband NIH, Bethesda, MD, USA), mit dessen Hilfe die Bilder der Gewebeschnitte in die für die

Rekonstruktionssoftware Amira notwendige einheitliche Länge und Breite konvertiert wurden. Zunächst wurden die *.tif-Dateien mit dem Programm geöffnet und mit dem Modul „Stack Builder“ (Plugins → Stacks → Stack Builder) zu einem Bildstapel („Stack“) konvertiert. Dadurch wurden kleinere Bilder an das größte geladene Bild durch das Anfügen von schwarzen Rändern auf die gleichen Abmessungen in Länge und Breite angepasst. Der so generierte Bildstapel wurde als Bildsequenz („Image Sequence“) gespeichert.

3.2.6.3 Amira

Zur dreidimensionalen renalen arteriellen Gefäßbaumrekonstruktion wurde der von ImageJ generierte Bildstapel mit der Software *Amira 5.4.2* (Mercury Computer Systems Inc, Chelmsford, MA, USA) geöffnet. Zur Gewährleistung der korrekten Skalierung der Daten wurde zunächst der Begriff Pixel durch den Begriff Voxel ersetzt. Als Kamera- und Objektiv-abhängiger Wert hat ein Pixel in dieser Arbeit die Maße 1x1 µm, da ein 10x-Objektiv verwendet wurde. Ein Voxel entspricht geometrisch einem Quader mit den Maßen 1x1x5 µm, weil die Schnittdicke der Paraffinschnitte 5 µm betrug. Außerdem wurde die BOUNDINGBOX definiert, welche, bezogen auf die maximalen Abmessungen des Bildstapels (Länge x und Breite y) und die Gesamtanzahl der Schnitte sowie die jeweilige Schnittdicke (z), die maximalen Abmessungen des Datensatzes in jeder Ebene beschreibt.

Farbkanaltrennung

Anschließend wurde der RGB-Datensatz in einzelne monochrome Kanäle aufgetrennt, um eine Erkennung der Fluoreszenzmarkierungen für Aktin und Renin separat anhand der Grauwerte der Pixel jedes aufgenommenen Bildes und eine getrennte Datensegmentierung zu ermöglichen:

- COMPUTE
- CHANNEL WORKS
- INPUT 1 CHANNEL 1 → Speichern als Aktin-Stapel
- INPUT 1 CHANNEL 2 → Speichern als Renin-Stapel

Alignment

Als nächster Schritt folgte das sogenannte Alignment, bei dem jeweils zwei der variabel auf dem Objektträger aufgebrachten histologischen Serienschnitte manuell durch Verschiebe- und Rotationsbewegungen zur Deckung gebracht wurden. Dies erfolgte anhand der Immunfluoreszenzen der α SMA-Daten, da diese im Vergleich zu den Immunfluoreszenzen von Renin quantitativ in größerer Anzahl vorhanden waren und so ein besseres Alignment ermöglichten. Durch Anwendung des Alignments auf alle Schnitte entstand eine gleichmäßig ausgerichtete Niere.

- COMPUTE
- ALIGN SLICES
- EDIT
- Automatisches Alignment und manuelle Feinabstimmung
- RESAMPLE

Datensegmentierung

Anschließend folgte die Datensegmentierung, das sogenannte Labeln. Mittels verschiedenen Verfahren wurden Strukturen, die von Interesse waren, markiert und einem bestimmten Material zugeordnet. Später konnte aus der Gesamtheit der markierten Strukturen die jeweilige Oberfläche für ein bestimmtes Objekt berechnet werden. Zu Beginn der Datensegmentierung wurden folgende Softwarefunktionen genutzt:

- LABELLING
- LABEL FIELD

Um die Fluoreszenzsignale zu markieren standen folgende unterschiedliche Hilfswerkzeuge zur Verfügung (Übersicht in alphabetischer Reihenfolge):

- BRUSH: Hiermit wurden Fluoreszenzsignale im Freihandmodus markiert.
- FILL HOLES: Dieses Werkzeug diente dem Auffüllen von Löchern in Materialien.
- INTERPOLATE: Interpolate ermöglichte die Ergänzung einer fehlenden Struktur durch Markierung der entsprechenden Strukturen auf den Schnitten vor und nach dem fehlerhaften Schnitt.

- **MAGIC WAND:** Mit diesem Werkzeug nutzt man die unterschiedliche Verteilung der Grauwerte (0=schwarz bis 255=weiß), um Fluoreszenzsignale durch das Festlegen einer Grauwertschwelle zu markieren. Zusammen mit dem ausgewählten Voxel wurde nur ein bestimmter, mit dem Voxel verbundener Bereich markiert.
- **REMOVE ISLANDS:** Hiermit ließen sich kleine Material-Inseln (Artefakte) automatisch entfernen.
- **SMOOTH LABELS:** Mit Hilfe dieses Werkzeugs konnten die Ränder von Materialien geglättet werden.
- **THRESHOLD:** Dieses Werkzeug ermöglichte die Selektion aller Voxel in einem definierten Grauwertbereich, wobei im Unterschied zu MAGIC WAND der gesamte Schnitt betroffen war.
- **WRAP:** Durch Markierung von Anfang, Mitte und Ende einer Zielstruktur konnten die Zwischenschnitte zu einer annähernd kugeligen Gestalt ergänzt werden. Dieses Werkzeug wurde zur Rekonstruktion von Glomeruli verwendet.

Alle diese Segmentierungsfunktionen ließen sich sowohl auf einen Schnitt (current slice), als auch auf alle Schnitte (all slices) anwenden.

Oberflächengenerierung

Der letzte Schritt der dreidimensionalen Rekonstruktion der Niere war die Oberflächengenerierung. Mittels der erstellten Labeldateien wurde für jedes Material eine separate Oberfläche generiert und räumlich dargestellt:

- **SURFACE GEN**
- Anhängen von SURFACE VIEW zur Darstellung der Oberfläche

Gefäße wurden anhand der Aktinfluoreszenzsignale rekonstruiert. Mit Hilfe der Renindaten wurde die Lokalisation und Anzahl reninexprimierender Zellen dargestellt. Die Glomeruli und die Kapsel der Niere wurden anhand ihrer Eigenfluoreszenz erkannt und dem entsprechenden Material zugeordnet.

Mittels des Moduls PROPERTIES konnten die dreidimensionalen Modelle bearbeitet und optimiert werden:

- SURFACE-EDITOR: Entfernen überflüssiger Ausschnitte
- SIMPLIFIER: Reduktion der Polygonzahl und somit der Datenmenge
- PARAMETER-EDITOR: Änderung von Skalierung und Farbeinstellung
- COMPUTE → SMOOTH SURFACE: Glättung der Oberfläche

Die entstandenen Objekte boten die Möglichkeit der räumlichen Analyse der renalen Strukturen. Die einzelnen Objekte konnten sowohl einzeln als auch zusammen mittels SURFACE VIEW dargestellt werden. Außerdem ermöglichte *Amira* die Messung von Strecken und die Berechnung von Volumina und Flächen der einzelnen Modelle.

3.2.7 Molekularbiologische Methoden

3.2.7.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA wurde mit dem TRIzol[®]-Reagenz nach einem Protokoll des Herstellers, basierend auf dem Guanidium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi, durchgeführt (Chomczynski & Sacchi 1987). Das TRIzol[®]-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat, die durch Zugabe von Chloroform in drei Phasen aufgetrennt wird. In einer wässrigen Phase lösen sich die RNA, relativ hydrophile Proteine in einer Interphase und die restlichen Proteine sowie die DNA in einer Phenolphase. Zur Vermeidung der Kontamination mit RNasen wurden bei allen Arbeitsschritten Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte benutzt. Sämtliche Vorgänge wurden auf Eis durchgeführt und für benötigte Puffer und Lösungen wurde mit Diethylen-Pyrocyanat (DEPC)-behandeltes Wasser verwendet. Die bei -80 °C gefrorenen, halbierten adulten Mausnieren wurden in je 1ml TRIzol[®]-Reagenz überführt und ca. 30 Sekunden homogenisiert. Diese Mischung wurde 5 Minuten bei RT belassen, hierbei denaturierten die Proteine und lösten sich in der Phenolphase des TRIzol[®]-Reagenz. Anschließend wurden je 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Mischung wurde geschüttelt. Nach Zentrifugieren (20 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde der wässrige Überstand in 500 µl Isopropanol 100 % (RT) überführt, kurz gevortext und 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Durch diesen Arbeitsschritt wurde die RNA ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde das entstandene Pellet, ohne den Überstand, in 75 %igen Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 7.500 rpm, 4 °C). Nachdem der

Überstand abermals verworfen wurde, wurde das Pellet 10 Minuten bei RT getrocknet, dann in ca. 300 µl RNase-freien Wasser gelöst und im Schüttler bei 65 °C maximal 2 Minuten resuspendiert.

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA in der Probe wurde diese im Photometer bei $\lambda_1=260$ nm und $\lambda_2=280$ nm vermessen. Anhand des Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm wurde die Qualität der isolierten RNA beurteilt. Nur bei einer Ratio 260/280 zwischen 1,8 und 2,0 wurde die RNA für die nachfolgenden Versuche verwendet.

3.2.7.2 cDNA-Synthese

Die complementary DNA (cDNA) wurde mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus der im vorangehenden Arbeitsschritt isolierten RNA synthetisiert. Diese Übersetzung in cDNA gewährleistet eine stabilere Konservierung der auf der RNA enthaltenen Informationen. Als Primer wurden für die cDNA-Synthese Oligo(dT)₁₅-Ketten verwendet, welche komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA sind.

10 µl Ansatz	
1 µg	Gesamt-RNA
1 µl	Oligo(dT) ₁₅ -Primer
Add	DEPC-H ₂ O

Dieses Reaktionsgemisch wurde für fünf Minuten auf 65 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde der in der folgenden Tabelle beschriebene Mix hinzugegeben.

Mix	
1 µg	M-MLV Reverse Transkriptase (100 U)
4 µl	dNTPs (2,5 mM)
4 µl	Puffer (5 x First strand buffer, Invitrogen)
3 µl	DEPC-H ₂ O

Die cDNA-Synthese wurde bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt und dauerte eine Stunde. Nach dieser Zeit wurde das Reaktionsgemisch zwei Minuten lang auf 94 °C erhitzt, um eine Inaktivierung der reversen Transkriptase zu erreichen. Für die Real-Time-PCR wurde die so synthetisierte DNA mit 20 µl nukleasefreien Wasser verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.7.3 *Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-Time-quantitative-PCR)*

Die Real-Time-quantitative-PCR (RT-qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion und erlaubt zusätzlich zur Vervielfältigung der DNA in vitro eine Quantifizierung der DNA in Echtzeit. Die RT-qPCR wurde mit dem Lightcycler 480® SYBR Green Master Kit von Roche an einem Light Cycler 480 (Roche, Mannheim) durchgeführt. Im Folgenden werden Primersequenzen, Reaktionsansatz für die RT-qPCR sowie Amplifikationsprotokoll tabellarisch aufgelistet.

Primer	Sequenz
GAPDH s	5'-ATGCCATCACTGCCACCCAGAAG-3'
GAPDH as	5'-ACTTGGCAGGTTTCTCCAGGCGG-3'
Renin s	5'-ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTC-3'
Renin as	5'-ATGCGGGGAGGGTGGGCACCTG-3'

10 µl Reaktionsansatz	
5 µl	Lightcycler 480® SYBR Green Master
0,5 µl	sense Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)
3 µl	dd H ₂ O
1 µl	cDNA

Amplifikationsprotokoll			
Phase	Zyklen	Temperatur	Dauer
Aktivierung	1	95 °C	15 min
Denaturierung	40	95 °C	15 s
Annealing	40	58 °C	20 s
Elongation	40	72 °C	20 s

Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus. Nachdem das Amplifikationsprotokoll beendet war, wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA beobachtet. Während die DNA langsam (0,1 °C/s) von 60 °C auf 95 °C erhitzt wurde, wurde kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Als Haushaltsgen diente GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

3.2.7.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte mittels PCR. Um die genomische DNA für dieses Verfahren zu gewinnen wurde die NaOH-Methode eingesetzt.

Nach Abschneiden von ca. 2 mm Mausschwanz wurde dieser in ein 1,5 ml PCR-Cup mit 100 µl 25 mM NaOH versetzt und für eine Stunde bei 96 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde bis zur Auflösung des Schwanzes gevortext sowie 10 µl Tris HCl (pH 8) zugegeben. Nach Zentrifugation (6 min, 10000 rpm) wurden 2 µl des gewonnen Überstandes (gDNA) für die Genotypisierungs-PCR verwendet. In den folgenden Tabellen werden Primersequenzen, Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes und Amplifikationsprotokoll der PCR für die Genotypisierung beschrieben.

Primer	Sequenz
BF	5'-GGGTGGGACTTTGGTGTAGAGAAG-3'
BB1	5'-TTTGAAGCGTGCAGAATGCC-3'
BB2	5'-GGAACGGATTTTGGAGGTAGTGTC-3'
BBlox	5'-TCTGGGTCCTGCTTCAGAATAGC-3'

PCR-Reaktionsansatz (20 µl)	
1 µl	sense Primer (10 pmol/µl)
1 µl	antisense Primer (10 pmol/µl)
2,5 µl	dNTPs (2,5 mM)
4 µl	Puffer (GoTaq buffer green)
0,3 µl	Taq
9,2 µl	H ₂ O
2 µl	gDNA

Amplifikationsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	2 min	Aktivierung
35	94 °C	30 s	Denaturierung
	56 °C	1 min	Annealing
	72 °C	1 min	Elongation
1	72 °C	2 min	Elongation
1	4 °C	∞	Store

Die PCR-Ansätze wurden auf ein Agarosegel (1,5 %) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese bei 120 V. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Genotypisierung von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl} und Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren auf einem Agarosegel. Das in Abbildung 3 gezeigte Δ-Fragment repräsentiert die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des geflochten PDGF-B Gens.

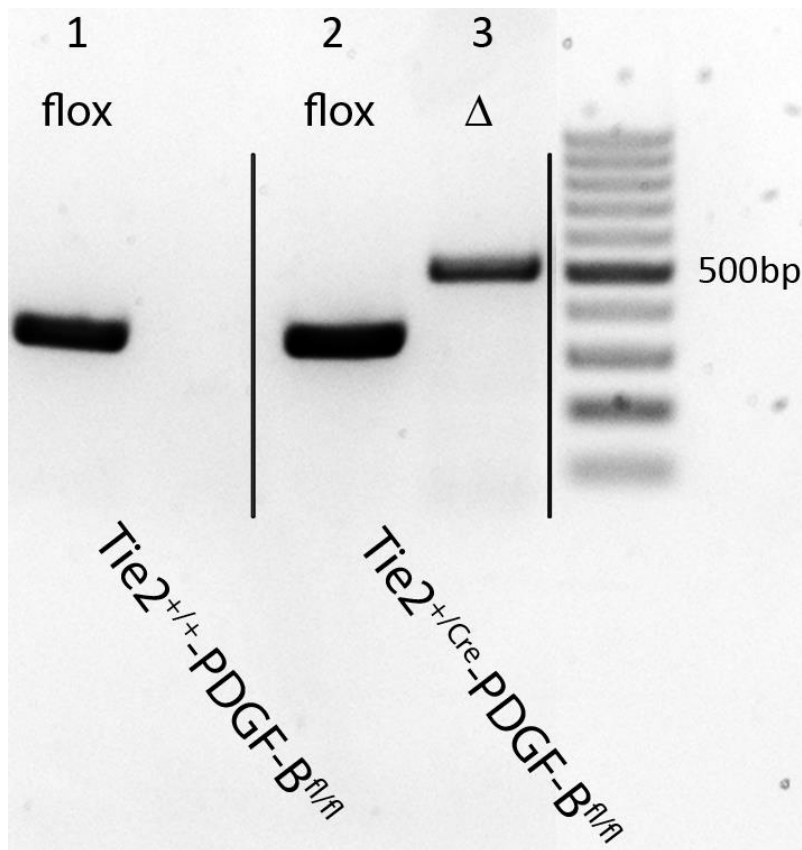


Abbildung 3: Genotypisierung von Tie-2^{+/-}-PDGF-BB^{fl/fl} (1) und Tie-2^{+/-}-Cre-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren (2). Das Δ-Fragment (3) repräsentiert die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des geflochten PDGF-B Gens.

3.2.8 Statistische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde für die statistische Auswertung der Daten *GraphPad Prism* 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Alle Werte werden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Werte für $p < 0,05$ werden als statistisch signifikant angesehen. Mittels Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) und der Bonferroni-Methode wurden die Ergebnisse der Renin-mRNA-Level zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen verglichen. Zur Analyse der Wanddicke afferenter Arteriolen bei Tie-2^{+/-}-Cre-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-}-PDGF-BB^{fl/fl}-Tieren wurde der unpaired t-test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Quantitative Analyse der Reninexpression mittels Renin-mRNA-Bestimmung

Um die Reninexpression von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- sowie von Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}- Versuchstieren in je drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien (E18, pp1, Adultstadium) analysieren und vergleichen zu können wurde zunächst die Renin-mRNA-Expression mittels Realtime-PCR quantitativ bestimmt. Mit diesem Versuch sollten potentielle Unterschiede der Renin-mRNA-Spiegel zwischen den beiden Versuchsgruppen aufgezeigt werden, da der konditionale Knockout von PDGF-BB in endothelialen Zellen zu einer verminderten Rekrutierung und Differenzierung von reninexprimierenden Zellen und ihrer Vorläuferzellen führen könnte. Anschließend wurde der Quotient aus Renin-mRNA und GAPDH-mRNA gebildet, mit dessen Hilfe die quantitative Reninexpression in Nieren von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen mit derjenigen in Nieren von Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren verglichen werden konnte. Außerdem wurde der Renin-mRNA-Spiegel in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Mäuse, nämlich an Embryonaltag 18, am ersten Tag post partum (pp1) und während des Adultstadiums im Alter von acht Wochen, bestimmt. Es wurden jeweils sechs bis acht Nieren pro Versuchsgruppe verwendet und aus den experimentell gewonnenen Daten Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) gebildet. Dieser Vergleich ergibt zwischen der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus zu den drei genannten Entwicklungszeitpunkten jeweils Unterschiede dahingehend, dass bei Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren die Renin-mRNA-Level im Vergleich erniedrigt sind. Eine Auswertung der Renin-mRNA-Level zeigt, dass diese Unterschiede nicht signifikant sind (siehe Abb. 4). Die Reninproduktion ist am ersten Tag post partum bei beiden Versuchsgruppen am höchsten, während sie im Adultstadium wieder abfällt.

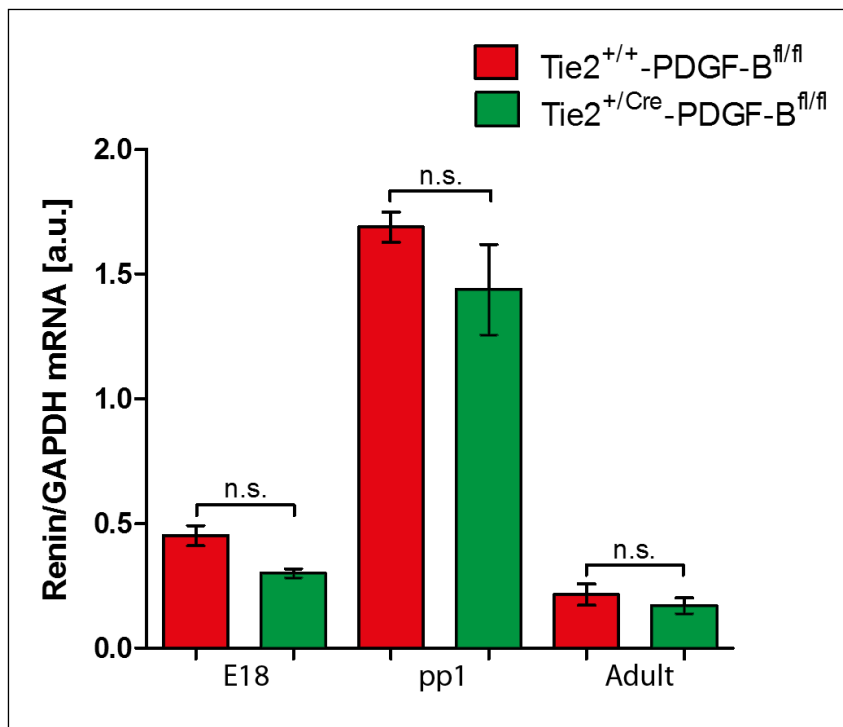


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Renin-mRNA-Level von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von je sechs bis acht Tieren pro Versuchsgruppe und Entwicklungsstadium, $p < 0,05$; E18 = Embryonic day 18, pp1 = post partum 1, Adult = adulte Tiere im Alter von 8 Wochen, n.s. = nicht signifikant.

Zusätzlich wurden bei adulten Mäusen zwei Gruppen gebildet, wobei die eine über zehn Tage Standardfutter und die andere über diesen Zeitraum Nidrigsalzfutter sowie ab dem 6. Tag der Versuchsreihe zusätzlich den ACE-Inhibitor Enalapril erhielt. Dieses Versuchsmodell wurde benutzt um zu untersuchen, ob bei Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren die Stimulierbarkeit der Reninproduktion nach pharmakologischer Entkopplung des RAS erhalten bleibt. Unter Nidrigsalz-Enalaprildiät zeigt sich, dass der Renin-mRNA-Spiegel bei Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 5 erhöht ist. Bei Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren ist der Renin-mRNA-Spiegel ebenfalls in der Nidrigsalz-Enalaprilgruppe um den Faktor 8 gesteigert. In der Kontrollgruppe ist bei Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}- gegenüber Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Tieren die Renin-mRNA-Expression erniedrigt. Bei der Nidrigsalz-Enalaprilgruppe zeigt sich bei Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen eine Erhöhung der Renin-mRNA-Expression. Diese Unterschiede weisen innerhalb der beiden Diätgruppen (Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus) jedoch keine signifikant unterschiedlichen Werte der Renin-mRNA-Level auf.

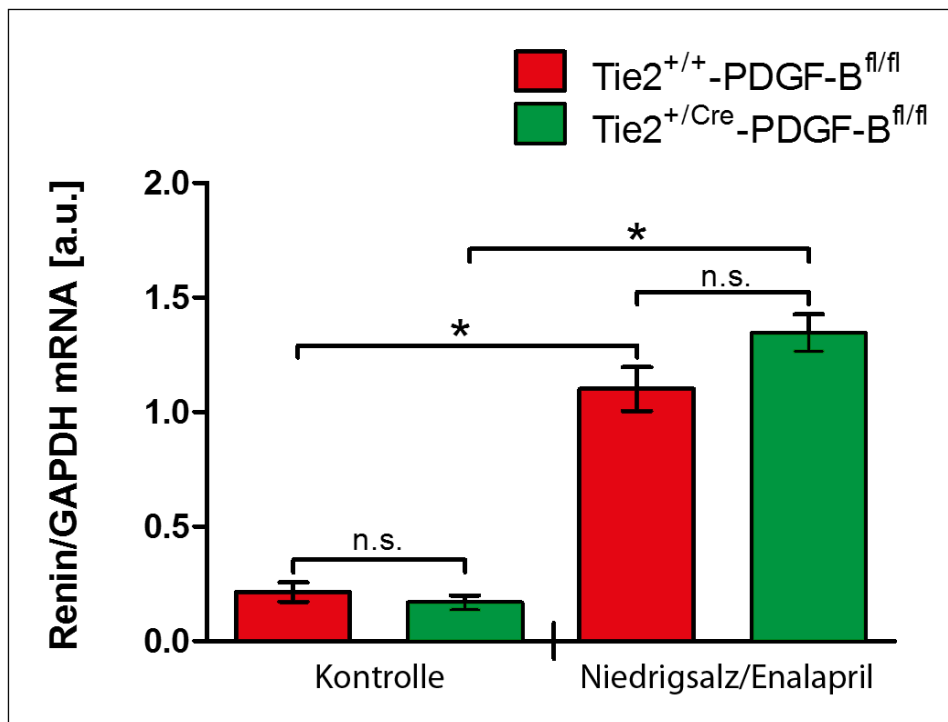


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Renin-mRNA-Level von Tie2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}- Versuchstieren unter Standard- und Niedrigsalz-Enalaprildiät. Aus Daten von je sechs Tieren pro Gruppe wurden Mittelwerte \pm SEM gebildet, $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant, * kennzeichnet signifikante Unterschiede von $p < 0,05$.

4.2 Histologische und dreidimensionale Analyse des arteriellen Gefäßsystems und der Reninexpression in der Niere

Durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen der Niere lassen sich die Lokalisation und das genaue Verteilungsmuster von Reninzellen analysieren. Die dreidimensionale Rekonstruktion des präglomerulären Gefäßsystems soll Aufschluss über die Struktur des Gefäßbaums geben. Außerdem kann mit der dreidimensionalen Analyse die räumliche Verteilung reninexprimierender Zellen präziser als auf zweidimensionalen Schnitten beurteilt werden. Anhand dieser Modelle sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Tie2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen untersucht und verglichen werden.

Der renale arterielle Gefäßbaum wird durch Immunfluoreszenzfärbungen von Glattmuskelaktin dargestellt. Die Reninexpression innerhalb der Niere wird ebenfalls anhand von Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht. Glomeruli und Nierenkapsel werden mithilfe ihrer Eigenfluoreszenz rekonstruiert.

4.2.1 Histologie der Gefäßstruktur und der Reninverteilung in der Niere der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum

Die Reninexpression der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum dient als Referenz für die Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus zum selben Entwicklungszeitpunkt. Ein Vergleich der beiden Genotypen soll Aufschluss über die Lokalisation und Stärke der Reninexpression in der Niere geben. Außerdem kann mit diesem Versuch die renale Gefäßstruktur in diesem Entwicklungsstadium beurteilt werden. Die histologische Detailaufnahme (siehe Abb. 6) der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum zeigt einen schematisch dargestellten Glomerulus mit zugehöriger afferenter und efferenter Arteriole. Reninpositive Zellen finden sich in der Tunica media des Vas afferens. In einigen Zellen im proximalen Anteil der afferenten Arteriole findet eine Koexpression von Renin und Glattmuskelaktin statt.

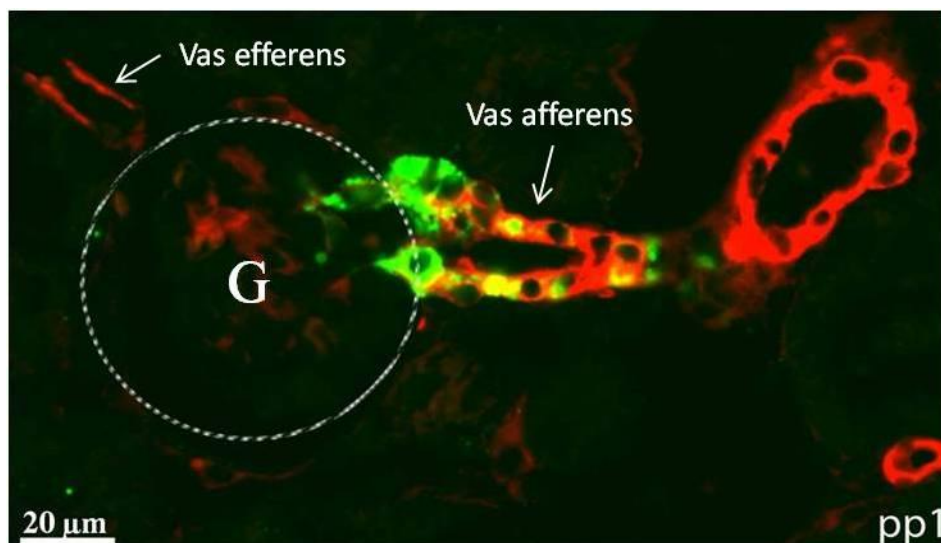


Abbildung 6: Histologische Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere einer Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), G = Glomerulus.

4.2.2 Histologie der Gefäßstruktur und der Reninverteilung in der Niere der Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum

Mit der histologischen Fluoreszenzfärbung der Niere der Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum soll untersucht werden, ob bereits in frühen Entwicklungsstadien pathologische Veränderungen des renalen Gefäßsystems und/oder der Expression und Lokalisation von Reninzellen auftreten.

Abbildung 7 zeigt eine afferente Arteriole einer Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus (pp1) mit Reninexpression in der Tunica media und schematisch dargestelltem Glomerulus. Einige Zellen des Vas afferens exprimieren sowohl Renin als auch Glattmuskelaktin.

Im Hinblick auf Quantität und Verteilung der reninexprimierenden Zellen zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren (pp1).

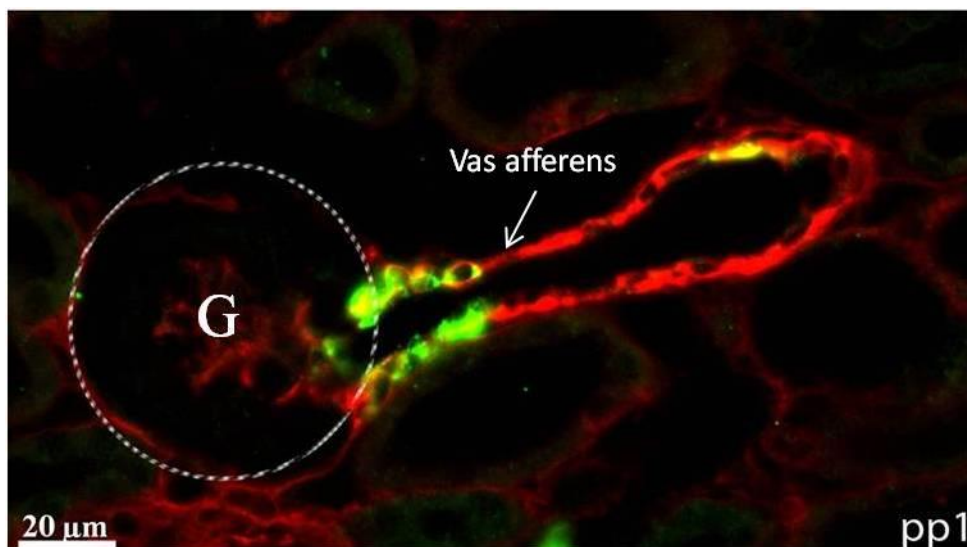


Abbildung 7: Histologische Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere einer unstimulierten Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), G = Glomerulus.

4.2.3 Wanddicke der afferenten Arteriole von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum

Die Wanddicke afferenter Arteriolen beträgt bei Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen am ersten Tag post partum $3,15 \pm 0,12 \mu\text{m}$ (N = 33). Zum gleichen Entwicklungszeitpunkt misst die Wand afferenter Arteriolen bei Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren $4,52 \pm 0,19 \mu\text{m}$ (N = 51). Afferente Arteriolen von Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen weisen somit eine signifikant verminderte Wanddicke im Vergleich zu Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren auf ($P < 0,001$).

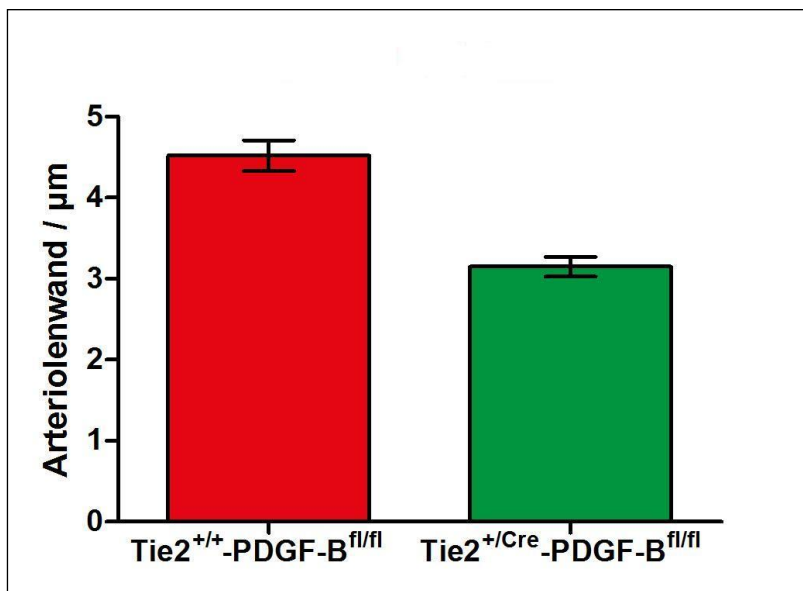


Abbildung 8: Grafische Darstellung der Arterienwanddicke in μm von Aa. afferentes von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen. Aus Daten von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen wurden Mittelwerte \pm SEM gebildet ($3,15 \pm 0,12 \mu\text{m}$ [N = 33] vs. $4,52 \pm 0,19 \mu\text{m}$ [N = 51]), $P < 0,001$.

4.2.4 Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus

Die histologischen Fluoreszenzfärbungen der Niere und die dreidimensionale Rekonstruktion des Gefäßbaums der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus dienen in dieser Arbeit als Referenz für die folgenden Rekonstruktionen von Gefäßbäumen anderer Versuchstiere.

Abbildung 9 zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Teilausschnitts des präglomerulären arteriellen Gefäßbaums. Vom arcuaten Seitenast gehen mehrere Interlobulararterien ab, von welchen sich wiederum afferente Arteriolen abzweigen. Die Gefäße sind schlank, homogen geformt und stellen in Form und Verlauf den physiologischen Normalzustand dar.

Die Reninexpression findet sich an typischer juxtaglomerulärer Position im Endbereich der afferenten Arteriolen, in unmittelbarer Nähe des vaskulären Pols des Glomerulus. Die Übersichtsaufnahme veranschaulicht, dass an fast allen afferenten Arteriolen Renin gebildet wird. Innerhalb der Interlobulararterien und des arcuaten Seitenasts findet keine Reninexpression statt.

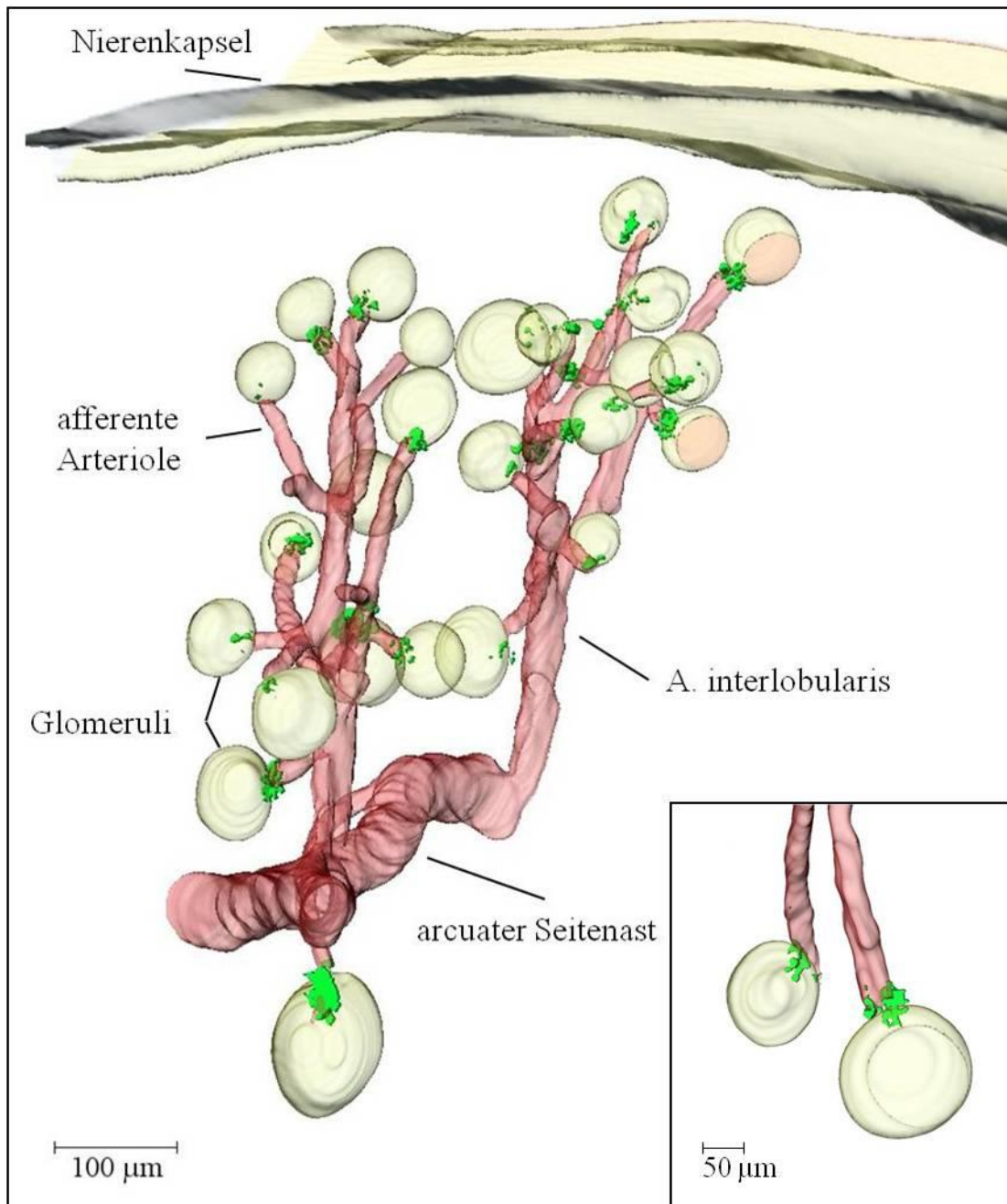


Abbildung 9: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der adulten $Tie-2^{+/+}$ -PDGF-BB^{n/n}-Maus. Dargestellt sind außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb).

Die in Abbildung 9 integrierte Detailaufnahme einer afferenten Arteriole zeigt die typische juxtaglomeruläre Position der Reninexpression.

Das Vorkommen reninpositiver Zellen wird in der histologischen Übersichtsaufnahme (siehe Abb. 10, Teilbereich A) veranschaulicht. Diese Zellen können bei der adulten $Tie-2^{+/+}$ -PDGF-BB^{n/n}-Maus ausschließlich am distalen Ende afferenter Arteriolen nachgewiesen werden. In

Aa. arcuatae, Aa. interlobulares und Aa. efferentes finden sich hingegen keine Expression von Renin.

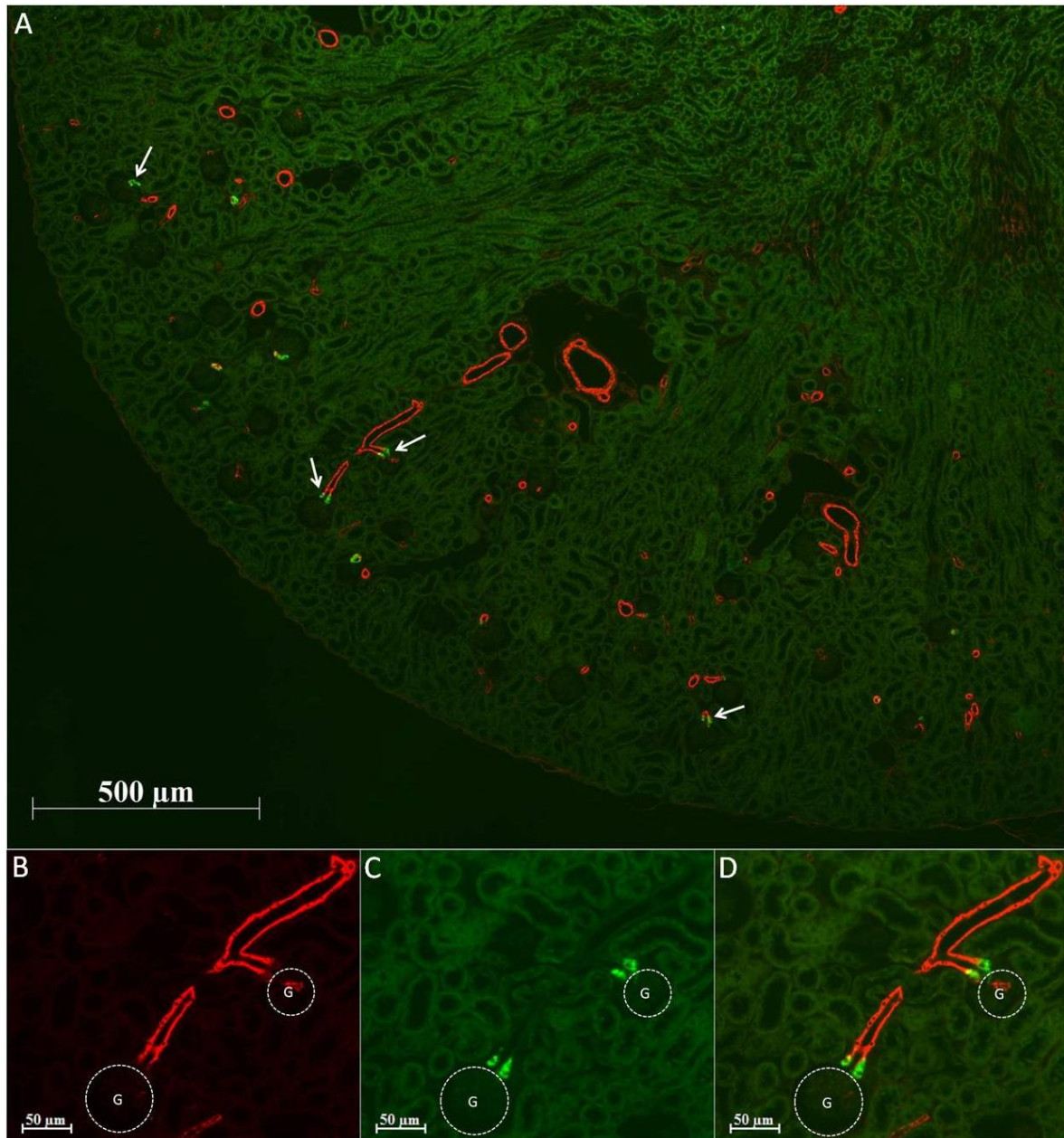


Abbildung 10: Histologische Übersicht- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere einer *Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{n/n}*-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus.

In der histologischen Detailaufnahme (Abb. 10, Teilbereich D) ist zu erkennen, dass reninexprimierende Zellen in der Tunica media der afferenten Arteriolen lokalisiert sind. In wenigen Zellen wird sowohl Renin als auch Glattmuskelaktin exprimiert.

4.2.5 Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus

Der dreidimensionale Gefäßbaum der Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus wurde mithilfe von histologischen Fluoreszenzfärbungen rekonstruiert, um das Verteilungsmuster von reninexprimierenden Zellen und die Struktur des präglomerulären arteriellen Gefäßbaums bei einem konditionalen Knockout der endothelial synthetisierten PDGF-B-Kette analysieren zu können.

In der dreidimensionalen Übersichtsaufnahme in Abbildung 11 ist ein Teilausschnitt des renalen Gefäßbaums der Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter basalen Bedingungen abgebildet. Dieser weist im Vergleich zur Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus hinsichtlich Reninexpressionsmuster, arterieller Gefäßform, -ausbildung und -länge keine Unterschiede oder Auffälligkeiten auf.

So entspringen dem arcuaten Seitenast mehrere Interlobulararterien, die sich wiederum in afferente Arteriolen aufzweigen. Die präglomerulären Gefäße stellen sich schlank und homogen geformt dar.

Das Auftreten reninexprimierender Zellen ist auf das distale Ende der afferenten Arteriolen beschränkt. Dort wird Renin von juxtaglomerulären Epitheloidzellen exprimiert.

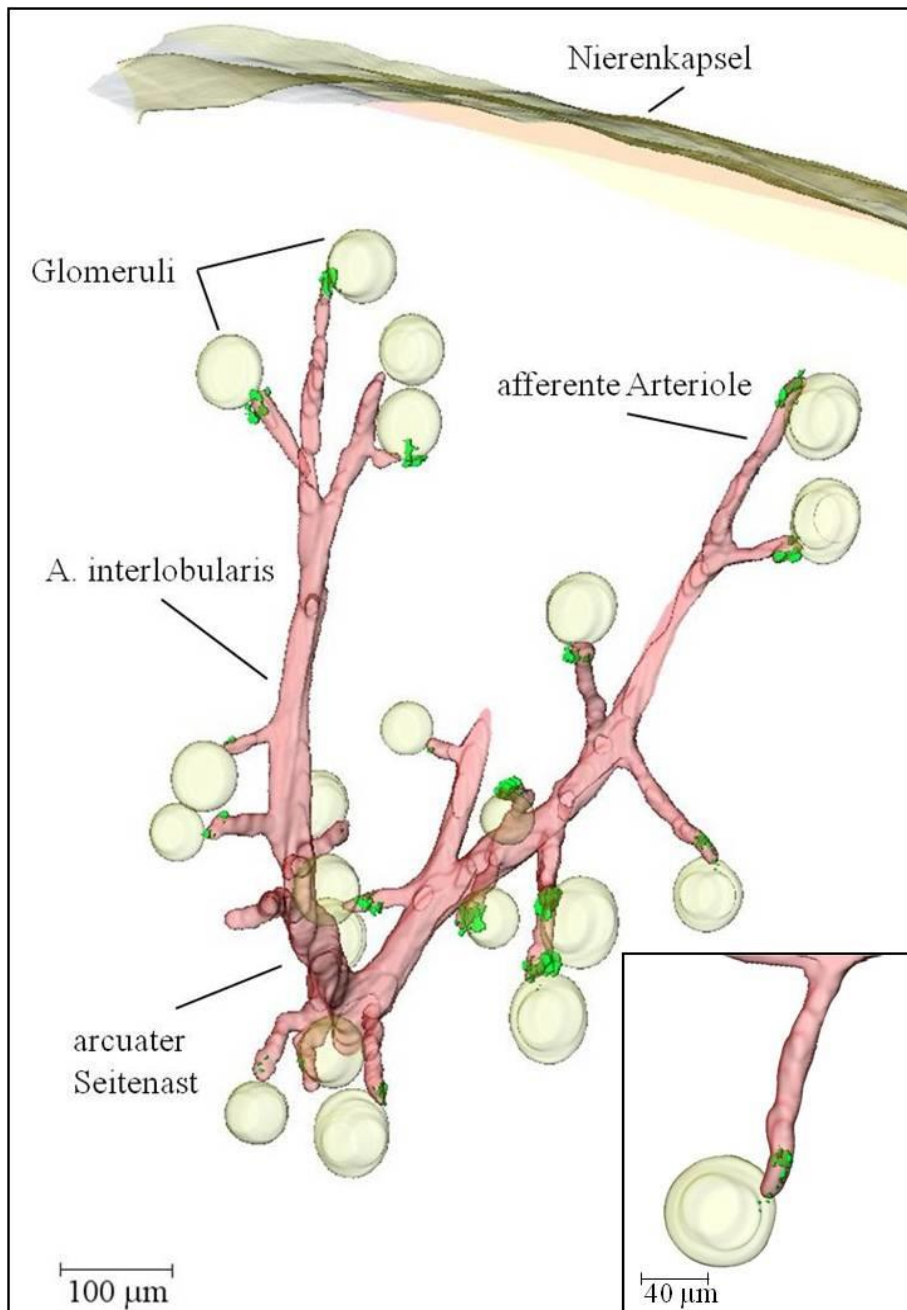


Abbildung 11: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der adulten $Tie-2^{+/Cre}$ -PDGF-BB $^{fl/fl}$ -Maus. Dargestellt werden außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb).

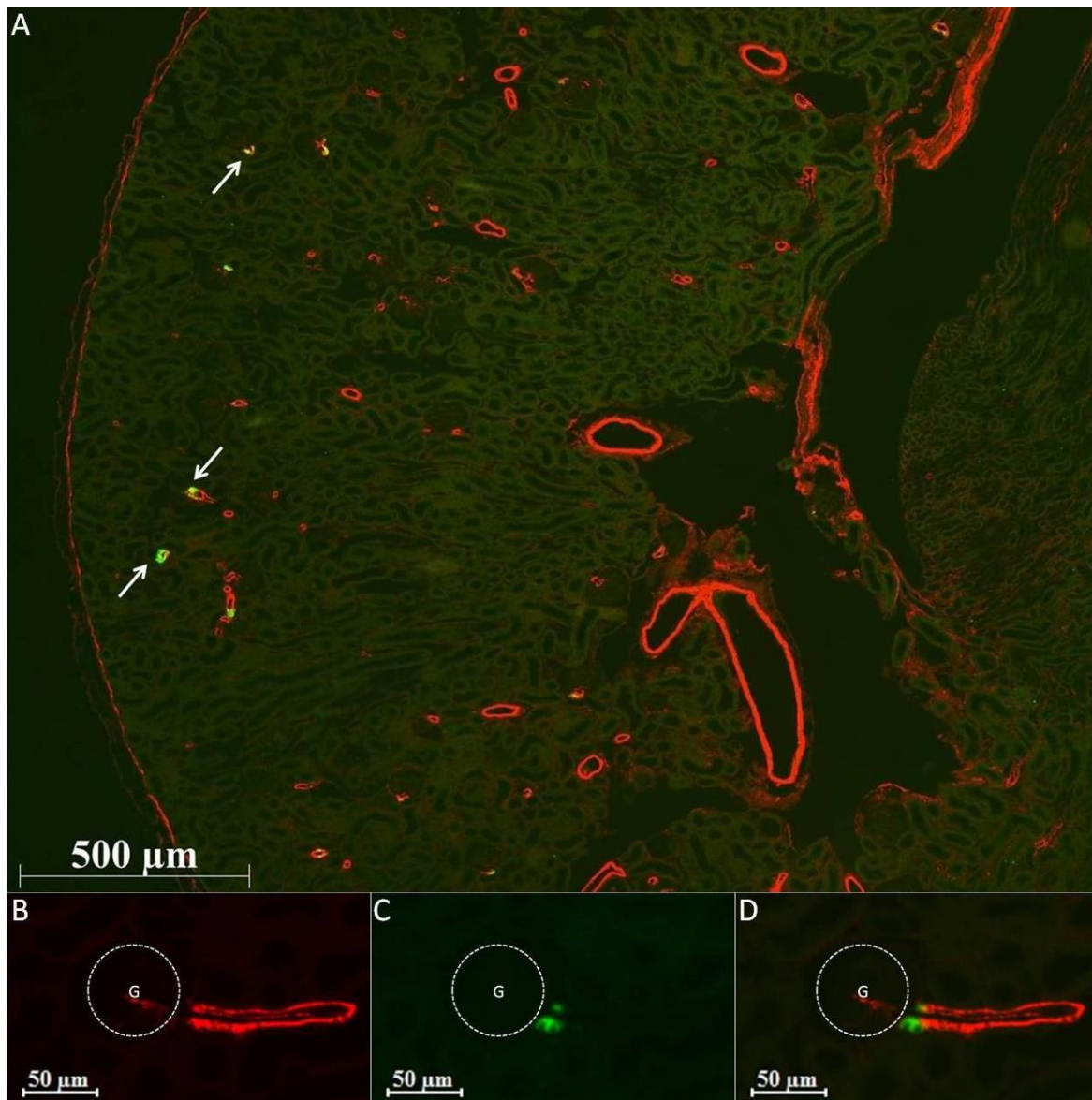


Abbildung 12: Histologische Übersichts- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere der unstimulierten Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus.

Die histologische Übersichtsaufnahme (siehe Abb. 12, Teilbereich A) stellt das Auftreten reninexprimierender Zellen bei der Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter basalen Bedingungen dar. Die Fluoreszenzsignale von Renin sind auf afferente Arteriolen beschränkt. In Aa. arcuatae, Aa. interlobulares und Aa. efferentes findet sich hingegen keine Expression von Renin.

Im histologischen Detailbild (siehe Abb. 12, Teilbereich D) wird die Reninexpression von Zellen der Tunica media afferenter Arteriolen veranschaulicht. Bei der Tie-2^{+/Cre}-PDGF-

BB^{fl/fl}-Maus zeigen sich ähnliche Ergebnisse für Ort, Stärke und Muster der Reninexpression wie bei der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus.

4.2.6 Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter Niedrigsalz-Enalaprildiät

Die Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus wurde rekonstruiert, um die physiologische Veränderung der Reninexpression in der Niere unter stimulierten Bedingungen darzustellen.

Bei der mit Niedrigsalz-Enalaprildiät stimulierten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus treten, verglichen mit der unstimulierten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus, vermehrt reninbildende Zellen auf. Renin wird verstärkt exprimiert und findet sich, zusätzlich zum klassischen juxtaglomerulären Expressionsort, auch in weiter proximal gelegenen Anteilen der afferenten Arteriolen und stellenweise in Interlobulararterien (siehe Abb. 13). Andere Reninexpressionsorte sind nicht nachweisbar. Die Gefäße des präglomerulären arteriellen Gefäßbaums sind schlank und gleichmäßig geformt. Von einem arcuaten Seitenast zweigen mehrere Aa. interlobulares ab, von denen wiederum afferente Arteriolen abgehen.

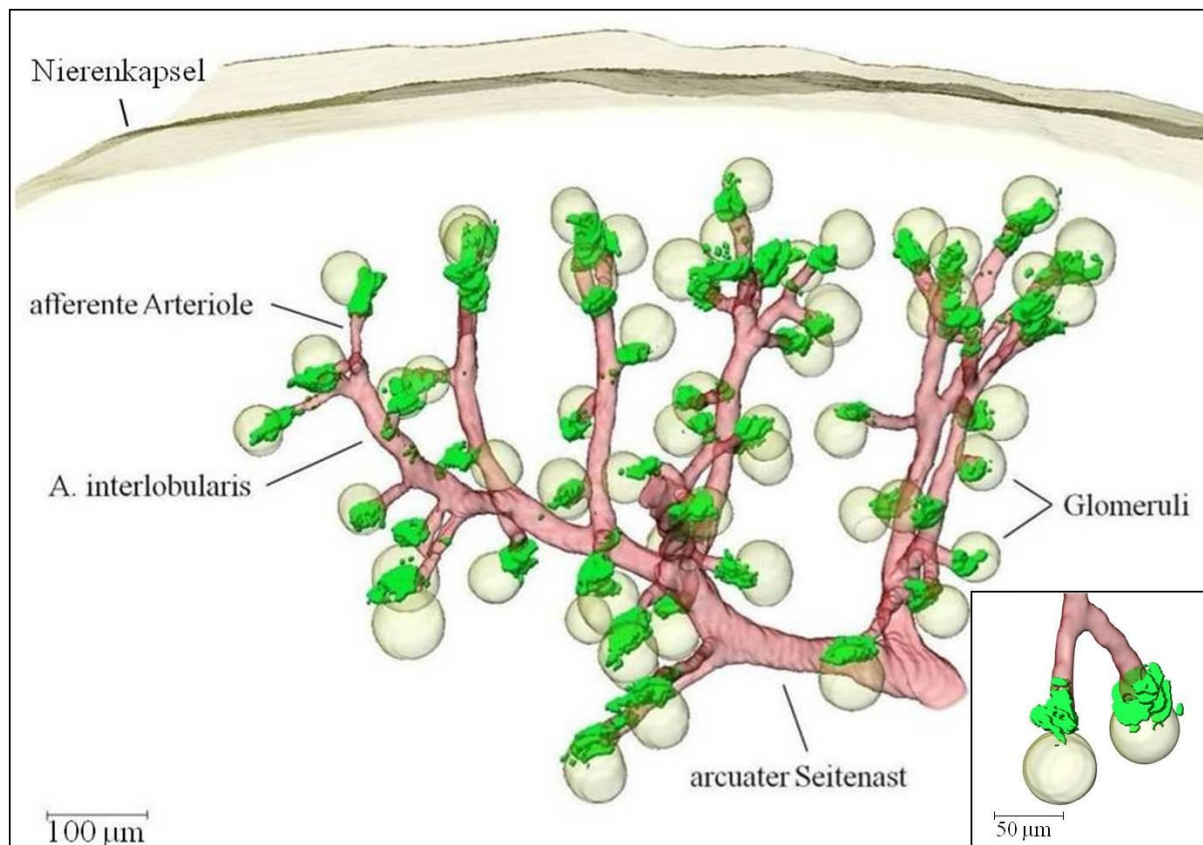


Abbildung 13: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der stimulierten Tie-2+/+-PDGF-BBfl/fl-Maus. Dargestellt sind außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb).

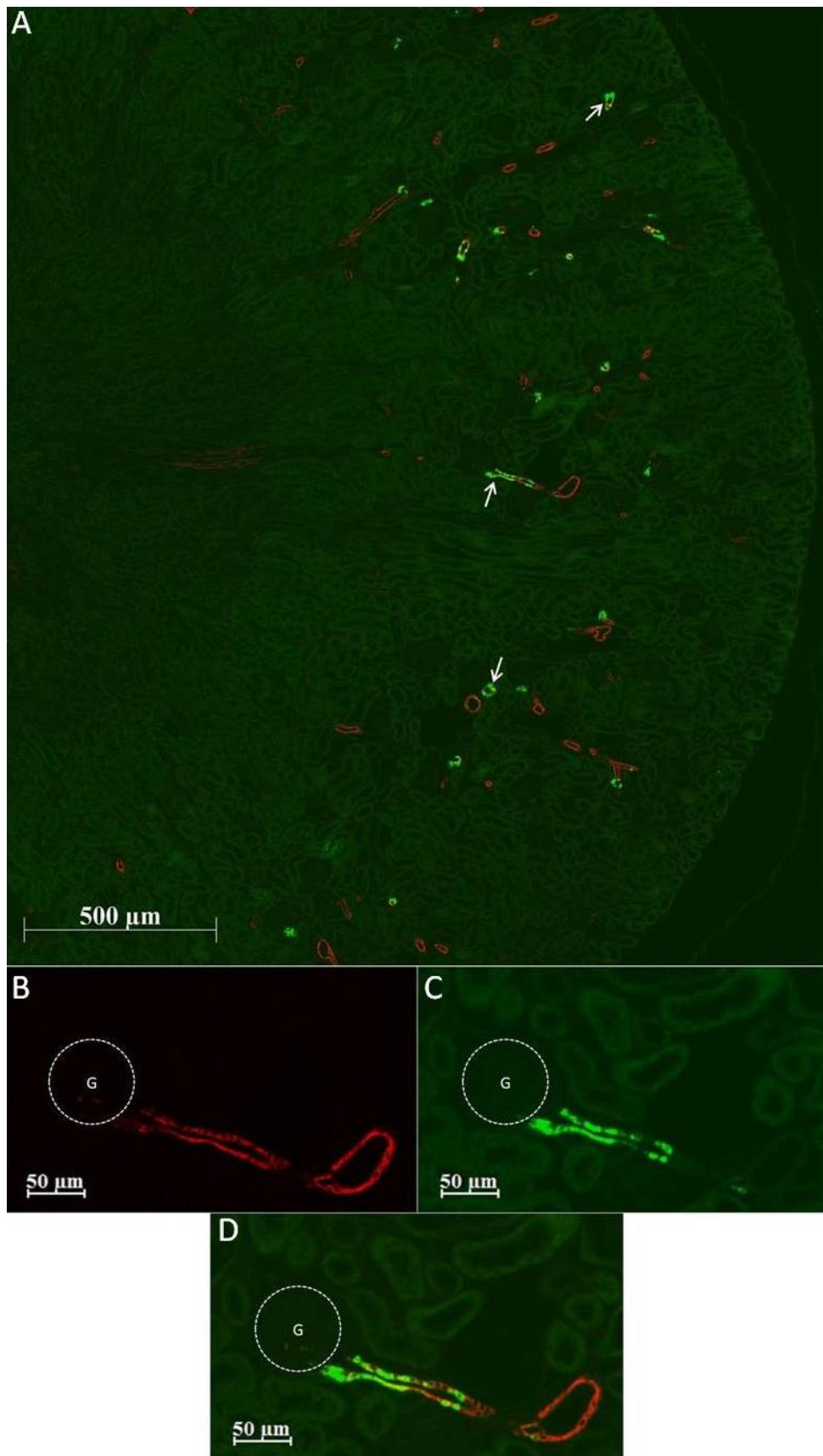


Abbildung 14: Histologische Übersicht- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere der stimulierten Tie-2^{+/+-}PDGF-BBfl/fl-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus.

Das Vorkommen reninexprimierender Zellen wird in der histologischen Übersichtsaufnahme veranschaulicht. Diese Zellen treten in afferenten Arteriolen auf.

Im histologischen Detailbild (siehe Abb. 14) fällt, im Vergleich zu Abbildung 10, die verstärkte Reninexpression sowie zusätzlich das Auftreten von weiter proximal in der afferenten Arteriole gelegenen reninbildenden Zellen auf. Renin wird von Zellen der Tunica media der afferenten Arteriole gebildet.

4.2.7 Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter Nidrigsalz-Enalapridiät

Der dreidimensionale Gefäßbaum der Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus wurde rekonstruiert, um das Verteilungsmuster von reninexprimierenden Zellen und die Struktur des Gefäßbaums während einer Stimulation des RAS unter einer Kombination aus Nidrigsalzdiät und ACE-Inhibitor-Behandlung beurteilen zu können. Dieser Versuch dient der Untersuchung, ob die Reninexpression der Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter stimulierten Bedingungen in einer ähnlichen retrograden Rekrutierung sowie Erhöhung der Anzahl von Reninzellen wie bei der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter Nidrigsalz-Enalapridiät mündet.

Das renale Blutgefäßsystem der stimulierten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus gleicht demjenigen der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus und unterscheidet sich nicht hinsichtlich Verlauf oder Form der präglomerulären arteriellen Gefäße. Der arcuate Seitenast ist der Ursprung mehrerer Interlobulararterien, die sich durch Aufzweigungen in afferente Arteriolen aufteilen. Auch hinsichtlich des Verteilungsmusters von Renin lassen sich, verglichen mit der stimulierten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus, keine Unterschiede feststellen. So findet bei der stimulierten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus ebenfalls eine gesteigerte Reninexpression mit zusätzlicher retrograder Aktivierung reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen statt.

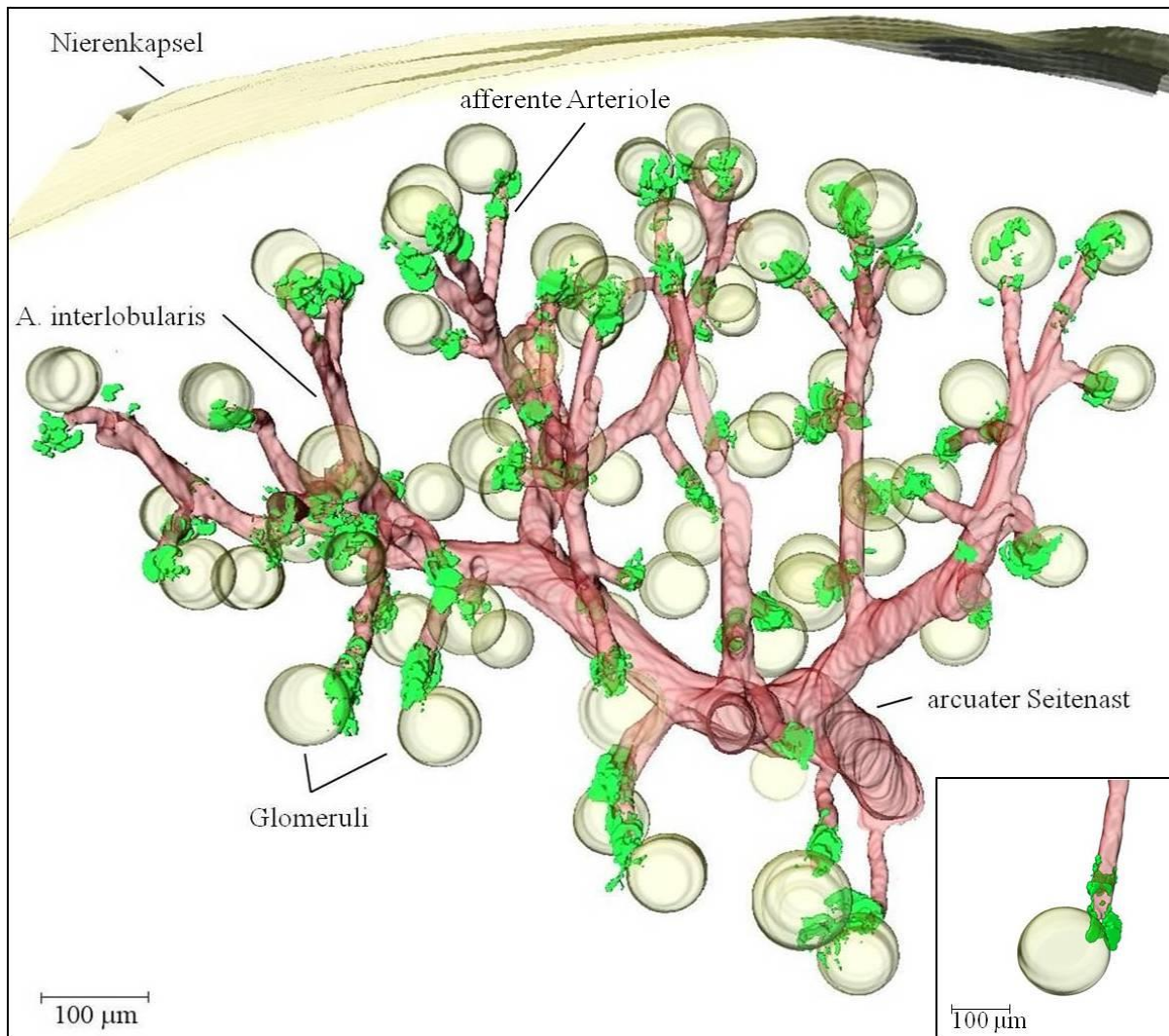


Abbildung 15: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der stimulierten $\text{Tie-2}^{+/Cre}$ -PDGF-BB $^{fl/fl}$ -Maus. Dargestellt werden außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb).

Die dreidimensionale Rekonstruktion im Detailbild sowie die histologische Übersichts- und Detailaufnahme zeigen, dass Renin von JG-Zellen gebildet wird (siehe Abb. 15 und 16). Stellenweise kommt es zu einer Reninexpression in Interlobulararterien. Andere Reninexpressionsorte in der Niere sind nicht nachweisbar. Im Vergleich zur $\text{Tie-2}^{+/+}$ -PDGF-BB $^{fl/fl}$ -Maus unter Niedrigsalz-Enalapridlidiät bestehen keine relevanten Unterschiede.

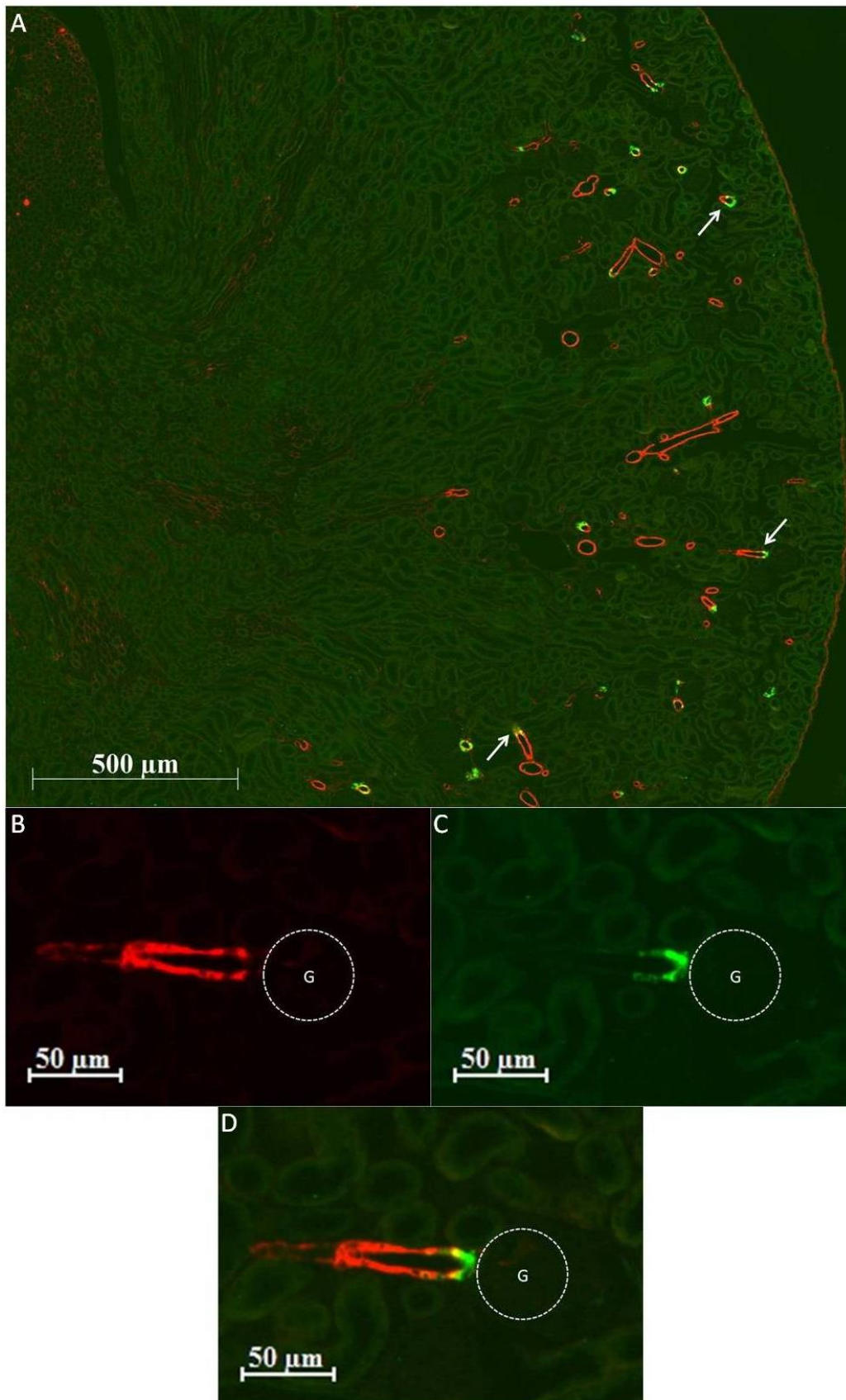


Abbildung 16: Histologische Übersicht- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere der stimulierten PDGF Tie-2+/Cre-PDGF-BBfl/fl-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus.

5 Diskussion

Um die Bedeutung von PDGF-BB für die Integration von Reninzellen in die Gefäßwand renaler Gefäße zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Vergleich zwischen dem renalen Reninexpressionsmuster in Quantität und Qualität sowie der präglomerulären Gefäßstruktur der Nieren von Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen und von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen angestellt. Tie-2 wird als Angiopoietin-Rezeptor von endothelialen Zellen exprimiert. Durch die Verwendung einer transgenen Tie-2^{+/-Cre}-Maus kann spezifisch eine endotheliale Cre-Expression sowie eine Deletion der PDGF-BB-Expression in endothelialen Zellen herbeigeführt werden (Kisanuki *et al.* 2001). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchstiere sind etwa gleich alt, so dass die Ergebnisse miteinander vergleichbar sind und nicht durch altersphysiologische Veränderungen verzerrt werden.

5.1 Vergleichende Analyse der Renin-mRNA-Spiegel

Die Renin-mRNA-Level der Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus wurden bestimmt, um zu überprüfen ob Reninzellen bei einem konditionalen Knockout von endothelial produziertem PDGF-BB adäquat rekrutiert und in das Gefäßsystem der Niere integriert werden können.

Die erhöhten Renin-mRNA-Spiegel bei Versuchs- und Kontrollgruppe am ersten Tag post partum im Vergleich zum Embryonalstadium (E18) und Adultstadium im Alter von acht Wochen stehen im Einklang mit vorangehenden Studien (siehe Abb. 4) (Machura *et al.* 2009; Neubauer *et al.* 2011). Zwischen Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen unterscheidet sich die Höhe des jeweiligen Renin-mRNA-Levels zu den unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten sowie unter Normalsalz- beziehungsweise Niedrigsalz-Enalapridil-Diät in nicht signifikantem Ausmaß. Allerdings zeigen Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäuse unter basalen Bedingungen in allen Entwicklungsstadien leicht reduzierte Renin-mRNA-Spiegel. Dies könnte auf eine leicht verminderte, aber erhaltene, Integration von potentiellen Reninzellen in die renale Gefäßwand bei einem selektiven Knockout der endothelial synthetisierten PDGF-B-Kette hindeuten.

Eine Behandlung von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren mit dem ACE-Inhibitor Enalapril über fünf Tage sowie mit einer zehntägigen Niedrigsalzdiät zur Stimulation des RAS führt, wie in der Literatur für Wildtypmäuse bereits beschrieben, bei beiden Gruppen zu einem starken Anstieg der Renin-mRNA-Level und der Reninproduktion (Holmer *et al.* 1993). Die Ergebnisse der Renin-mRNA-Bestimmung unter LSE-Diät zeigen, dass bei Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen die physiologische Stimulierbarkeit des RAS mit gesteigerter Reninsynthese durch eine Niedrigsalzdiät und Behandlung mit ACE-Inhibitoren erhalten ist (Holmer *et al.* 1993).

5.2 Vergleichende Analyse der histologischen Schnitte und rekonstruierten Gefäßbäume

Da zwischen dem Renin-mRNA-Spiegel der Tie-2^{+Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus und dem der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus zu den drei verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (Embryonaltag 18, postpartal Tag 1, Adultstadium) zwar keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren, aber weiterhin die Möglichkeit gegeben war, dass die Tiere ein unterschiedliches räumliches Verteilungsmuster der Reninexpression aufweisen könnten, wurden Morphologie sowie Verteilung reninbildender Zellen mittels histologischer Färbungen und dreidimensionaler Rekonstruktionen des renalen Gefäßbaums analysiert. Auch im Hinblick auf die präglomeruläre arterielle Gefäßentwicklung ist die histologische und dreidimensionale Analyse von großer Bedeutung, da bei Tieren mit Knockouts der endothelial produzierten PDGF-BB-Kette Gefäßanomalien wie beispielsweise Mikroaneurysmen, dilatierte Mikrogefäße sowie unregelmäßige Gefäßdiameter und eine unregelmäßige Kapillardichte beschrieben wurden (Enge *et al.* 2002; Bjarnegard *et al.* 2004). Die immunhistochemische Fluoreszenzfärbung der Serienschnitte basiert auf etablierten Primärantikörpern für Renin und α -Glattmuskelaktin, einem Marker für glatte Muskelzellen (Machura *et al.* 2009).

5.2.1 Histologie der Gefäßstruktur und der Reninverteilung in der Niere der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und der Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus im Vergleich

Sowohl bei Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- als auch bei Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen ist die Reninexpression am ersten Tag post partum an juxtaglomerulärer Position in der Tunica media der afferenten Arteriole lokalisiert. Bei Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen ist eine verminderte Wanddicke der afferenten Arteriole festzustellen. In der Arbeit von Bjarnegard *et al.* 2004 wurde Tie-1 als Promotor zum konditionalen Knockout des endothelial synthetisierten PDGF-B-Proteins verwendet. Durch diesen Knockout kommt es zu einem Ballooning des glomerulären Kapillarnetzes während der Perinatalperiode, was auf ein Fehlen mesangialer Zellen zurückzuführen ist. Drei Wochen postnatal entspricht die Anzahl der Mesangialzellen allerdings wieder annähernd dem physiologischen Zustand. Die von Bjarnegard *et al.* 2004 beschriebenen postpartal dilatierten Glomeruli konnten im Rahmen dieser Arbeit nur vereinzelt beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich im konditionalen PDGF-B Knockout eine vorübergehende Verringerung der Wanddicke afferenter Arteriolen in neonatalen Nieren (siehe Abb. 8). Im adulten Organ war dieser Befund nicht mehr zu sehen. Diese Reduktion der Gefäßwandstärke könnte auf eine verminderte Rekrutierung von Perizyten durch die reduzierte endotheliale PDGF-Produktion zurückzuführen sein.

5.2.2 Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus im Vergleich

Die adulte Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter Normalsalzdiät zeigt die physiologische Verteilung von Reninzellen, welche in typischer juxtaglomerulärer Position am vaskulären Pol des Glomerulus in der Tunica media von afferenten Arteriolen liegen. In größeren renalen Gefäßen wie arcuaten Seitenästen und Interlobulararterien finden sich keine reninsynthetisierenden Zellen. Diese Beobachtungen stimmen mit bisherigen Erkenntnissen über die physiologische Reninexpression überein (Barajas 1979; Taugner *et al.* 1984). Im dreidimensionalen präglomerulären arteriellen Gefäßbaum stellen sich die rekonstruierten Gefäße gleichmäßig geformt und schlank dar, was den anatomischen Normalzustand darstellt und im Einklang mit vorangehenden Studien steht (Sauter *et al.* 2008; Machura *et al.* 2009).

Hinsichtlich der Verteilung von reninproduzierenden Zellen bei der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter Normalsalzdiät ergeben sich im Vergleich mit der Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus keine relevanten Unterschiede. Auch bei diesem Versuchsmodell sind die Reninzellen nur an typischer juxtaglomerulärer Stelle in der Tunica media afferenter Arteriolen lokalisiert und kommen in weiteren renalen Gefäßabschnitten nicht vor. Der Gefäßbaum der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter Normalsalzdiät zeigt hinsichtlich seiner Morphologie keine relevanten Veränderungen der Gefäßform, -dicke und -länge. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, wonach bei der PDGF-BB-Maus keine signifikanten Änderungen der Gefäßlänge oder Veränderungen der Anzahl von Gefäßverzweigungen auftreten (Hellstrom *et al.* 2001). Bei einem selektiven Knockout der PDGF-B-Kette in Mäusen treten vor allem im Embryonalalter Dilatationen renaler Gefäße auf, bei adulten Tieren ist aber nur noch ein leicht erhöhter Durchmesser der glomerulären Kapillaren nachweisbar (Bjarnegard *et al.* 2004). Solche erhöhten Durchmesser renaler Gefäße sind bei der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus allerdings nicht nachweisbar.

In unterschiedlichen Studien wurde gezeigt, dass bei einem totalen und selektiven Knockout von PDGF-BB die Anzahl von Perizyten und vaskulären Glattmuskelzellen in der Niere reduziert ist. Außerdem stellen renale Perizyten einen wichtigen Faktor für die vaskuläre Entwicklung dar und werden bei einem Knockout von PDGF-BB nicht adäquat in Gefäßwände integriert (Lindahl *et al.* 1997; Hellström *et al.* 1999; Hellstrom *et al.* 2001; Lindblom *et al.* 2003; Bjarnegard *et al.* 2004; Stratman *et al.* 2010). Die Induktion von Vorläuferzellen der Perizyten und vaskulären Glattmuskelzellen scheint zwar bei PDGF-B-defizienten Mäusen unabhängig von PDGF-B abzulaufen. Die anschließende Ko-Migration und Proliferation dieser Zellen verläuft aber PDGF-B-abhängig (Hellström *et al.* 1999). Bei einem Zutreffen des hypothetischen Ansatzes dieser Arbeit, dass Reninzellen wie Perizyten über den PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg in die renalen Gefäßwände integriert werden sowie sich von diesen Zellen ableiten, wäre eine fehlende beziehungsweise verminderte Expression und Integration in renale Gefäßwände von reninpositiven Zellen zu erwarten gewesen. Da dies nicht der Fall ist, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Integration von Reninzellen in den renalen Gefäßbaum bei der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unabhängig von endothelial synthetisiertem PDGF-BB abläuft.

Gegen eine Beteiligung des PDGF-B-PDGFR- β -Signalwegs bei der Integration von Reninzellen in die Gefäßwand der Niere spricht außerdem die Tatsache, dass reninexprimierende Zellen der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter basalen

Bedingungen an physiologischer juxtaglomerulärer Position in der Tunica media der afferenten Arteriole lokalisiert sind (Barajas 1979; Taugner *et al.* 1984).

5.2.3 Architektur des Gefäßbaums und der Reninverteilung in der Niere der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter LSE-Diät im Vergleich

Der bereits in der Renin-mRNA-Analyse beobachtete starke Anstieg der Reninexpression bei adulten Tie-2^{+/-}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen unter LSE-Diät zeigt in histologischer Färbung und dreidimensionaler Rekonstruktion sein morphologisches Korrelat: so kommt es durch Niedrigsalzdiät sowie Inhibition des ACE und einem hiermit verbundenen Abfall des ANGII-Spiegels über eine Stimulation des RAS zu einer reaktiven Rekrutierung reninproduzierender Zellen in weiter proximal gelegenen Anteilen der afferenten Arteriole sowie stellenweise in Interlobulararterien (Hackenthal *et al.* 1990). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen in der Literatur und konnten in dieser Arbeit erneut reproduziert werden (Gomez *et al.* 1988; Gomez *et al.* 1990; Fuchs *et al.* 2002; Machura *et al.* 2009).

Der rekonstruierte Gefäßbaum der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus unter LSE-Diät weist ebenfalls eine retrograde Rekrutierung von reninexprimierenden Zellen in afferenten Arteriolen und vereinzelt in Interlobulararterien auf. In anderen Gefäßanteilen und Bereichen der Niere tritt keine Reninexpression auf. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Integration von Reninzellen in die Gefäßwand von Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen nicht über den PDGF-B-PDGR-β-Signalweg gesteuert wird, da die Anzahl der Reninzellen weder vermindert noch eine Lokalisation reninexprimierender Zellen an unphysiologischer Stelle nachzuweisen ist. Außerdem ist eine Stimulation des RAS mit physiologischer Steigerung der Reninexpression durch LSE-Diät auch bei der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus möglich. Die reaktive Rekrutierung reninsynthetisierender Zellen erfolgt nach dem gleichen retrograden Muster wie bei der Tie-2^{+/-}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus in Interlobulararterien sowie proximal gelegenen Anteilen der Vasa afferentia und zeigt keine pathologischen Veränderungen.

5.2.4 Zusammenfassende Analyse der histologischen Schnitte und rekonstruierten Gefäßbäume

Wie in der Literatur für Wildtypmäuse bereits beschrieben, wird Renin bei allen vier Versuchsgruppen in der Niere nur in afferenten Arteriolen sowie unter LSE-Diät verstärkt in weiter proximal gelegenen Anteilen des präglomerulären arteriellen Gefäßbaums exprimiert (Barajas 1979; Taugner *et al.* 1984; Gomez *et al.* 1988). Weitere Expressionsorte von Renin sind nicht nachweisbar. Eine Koexpression von Renin und Glattmuskelaktin in einigen afferenten Arteriolen findet, übereinstimmend mit vorangehenden Studien, sowohl bei Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- als auch bei Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen stellenweise vor allem in distalen Bereichen der afferenten Arteriole statt (Sauter *et al.* 2008).

Die Verwendung von Tie-1 als Promotor zur Deletion von PDGF-BB in endothelialen Zellen führt zu keinen relevanten Störungen in Nieren adulter Tiere. Während der Perinatalperiode resultiert diese Deletion in einem Ballooning des glomerulären Kapillarnetzes, was auf ein Fehlen mesangialer Zellen zurückzuführen ist (Bjarnegard *et al.* 2004). Ein ähnliches Phänomen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von Tie-2 als Promotor zur Deletion von endothelial synthetisiertem PDGF-BB, da bei Knockoutmäusen am ersten Tag post partum eine verminderte Wanddicke der afferenten Arteriole zu beobachten ist. Dies lässt auf eine erfolgreiche Inhibition von endothelial produziertem PDGF-BB schließen.

Auf Form, Länge und Verlauf der präglomerulären Gefäße hat dieser Knockout keine Auswirkungen. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, wonach bei der PDGF-BB- und PDGFR- β -KO-Maus keine signifikanten Änderungen der Gefäßlänge oder Veränderungen der Anzahl von Gefäßaufzweigungen auftreten (Hellstrom *et al.* 2001). In der Arbeit von (Enge *et al.* 2002) mündet eine Deletion der von Endothelzellen produzierten PDGF-B-Kette bei Mäusen mit verminderter Anzahl an Perizyten in multiplen Störungen des vaskulären Systems wie Mikroaneurysmen, unregelmäßigen Durchmessern der Mikrogefäße sowie einer unregelmäßigen Kapillardichte. Dies könnte auf eine insuffiziente Inhibition von endothelial synthetisiertem PDGF-BB in dieser Arbeit hindeuten. Jedoch stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit vorangehenden Beobachtungen überein, bei denen bei adulten Tieren drei Wochen postnatal die Anzahl mesangialer Zellen wieder annähernd dem Normalzustand entspricht, auch wenn der Kapillardurchmesser weiterhin leicht erhöht ist (Bjarnegard *et al.* 2004). Nicht ganz auszuschließen wäre außerdem eine Sekretion von PDGF-BB durch Zellen

der renalen Adventitia, die den fehlenden Effekt der endothelialen PDGF-BB-Synthese mitbeeinflusst und überlagert (Meliss *et al.* 1999). In dieser Arbeit wurden Mäuse mit Hilfe des Cre-loxP-Systems unter Verwendung von Tie-2, einem starken Regulator von Cre, als Promotor zur Deletion von PDGF-BB in endothelialen Zellen generiert (Suri *et al.* 1996; Wagner *et al.* 2010). Die Genotypisierung der Versuchstiere (siehe Abb. 3) zeigt jedoch eine erfolgreiche Cre-lox-Rekombination, welche eine insuffiziente Inhibition der PDGF-BB-Synthese in endothelialen Zellen unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Die Integration von Perizyten in sich entwickelnde Gefäßwände erfolgt mittels endothelial produziertem PDGF-BB über den PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg (Lindblom *et al.* 2003; Stratman *et al.* 2009). Dieses durch endotheliale Zellen synthetisierte PDGF-BB ist außerdem ein wichtiger Wachstumsfaktor für vaskuläre Entwicklungsprozesse wie die Rekrutierung von Perizyten zu sich in der Entwicklung befindlichen endothelialen Zellröhren sowie der hiermit einhergehenden vaskulären Basalmembranentwicklung (Lindblom *et al.* 2003; Stratman *et al.* 2009). Der PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg ist besonders für die Entwicklung und Vaskularisierung der Niere von großer Bedeutung, da PDGF-BB ein essentieller Wachstumsfaktor für die Rekrutierung mesenchymaler Zellen ist (Heldin & Westermark 1999). Aus dem Mesenchym differenzieren murale Zellen wie Perizyten, vaskuläre Glattmuskelzellen und reninsynthetisierende Zellen sowie Mesangialzellen (Soriano 1994; Lindahl *et al.* 1997; Lindahl *et al.* 1998; Enge *et al.* 2002). Diese gemeinsame mesenchymale Vorläuferzelle wird auch als Foxd1⁺-Zelle bezeichnet (Sequeira Lopez & Gomez 2011). Laut einer Studie von (Berg *et al.* 2013) sind auch Perizyten im Interstitium der Niere vor allem während der Metanephrogenese sowie in der Fetal- und frühen Postnatalperiode in der Lage Renin zu exprimieren. Dies deutet ebenfalls auf eine Abstammung von Reninzellen und Perizyten von einer gemeinsamen Vorläuferzelle hin. Trotz der gemeinsamen Abstammung von mesenchymalen Vorläuferzellen erfolgen Aktivierung sowie Integration von reninexprimierenden Zellen in sich entwickelnde Gefäßwände laut den Ergebnissen dieser Arbeit unabhängig von PDGF-BB und werden demzufolge über unterschiedliche Signalwege reguliert.

Da sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen adulten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen im Hinblick auf Höhe der Renin-mRNA-Level, die Lokalisation von Reninzellen in der Niere und die dreidimensionale renale Gefäßbaumanalyse ergaben, werden reninexprimierende Zellen und/oder ihre Vorläuferzellen

folglich über einen anderen Mechanismus als den PDGF-B-PDGFR- β -Signalweg aktiviert sowie in sich entwickelnde Gefäßwände integriert.

6 Anhang

6.1 Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Vorfeld veröffentlicht:

Neubauer, B., Machura, K., Rupp, V., Tallquist, M.D., Betsholtz, C., Sequeira-Lopez, M.L.S., Ariel Gomez, R. & Wagner, C. 2013. Development of renal renin-expressing cells does not involve PDGF-B-PDGFR- β signaling. *Physiol Rep* **1**, n/a.
<http://dx.doi.org/10.1002/phy2.132>.

6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung von Signalkaskade und Auswirkungen des klassischen RAS _____ 13
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Bindungsmusters der PDGF-Liganden an die PDGF-Rezeptoren. Durchgezogene Pfeile stellen die Fähigkeit der fünf PDGF-Liganden dar, die homo- beziehungsweise heterodimeren Rezeptorkomplexe zu aktivieren. Der gestrichelte Pfeil zeigt eine postulierte Bindung an. Modifiziert nach Fredriksson *et al.* 2004. _____ 21
- Abbildung 3:** Genotypisierung von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl} (1) und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren (2), Das Δ -Fragment (3) repräsentiert die Cre-Rekombinase vermittelte Deletion des geflochten PDGF-B Gens. _____ 45
- Abbildung 4:** Grafische Darstellung der Renin-mRNA-Level von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von je sechs bis acht Tieren pro Versuchsgruppe und Entwicklungsstadium, $p < 0,05$; E18 = Embryonic day 18, pp1 = post partum 1, Adult = adulte Tiere im Alter von 8 Wochen, n.s. = nicht signifikant. _____ 47
- Abbildung 5:** Grafische Darstellung der Renin-mRNA-Level von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Versuchstieren unter Standard- und Nidrigsalsz-Enalapridliät. Aus Daten von je sechs Tieren pro Gruppe wurden Mittelwerte \pm SEM gebildet, $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant, * kennzeichnet signifikante Unterschiede von $p < 0,05$. _____ 48
- Abbildung 6:** Histologische Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere einer Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum. Immunfluoreszenzfärbung von Glattnuskelaktin (rot) und Renin (grün), G = Glomerulus. _____ 49
- Abbildung 7:** Histologische Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere einer unstimulierten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus am ersten Tag post partum. Immunfluoreszenzfärbung von Glattnuskelaktin (rot) und Renin (grün), G = Glomerulus. ____ 50
- Abbildung 8:** Grafische Darstellung der Arteriolennanddicke in μm von Aa. afferentes von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen. Aus Daten von Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}- und Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Mäusen wurden Mittelwerte \pm SEM gebildet ($3,15 \pm 0,12 \mu\text{m}$ [N = 33] vs. $4,52 \pm 0,19 \mu\text{m}$ [N = 51]), $P < 0,001$. _____ 51
- Abbildung 9:** Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattnuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen

Gefäßbaumabschnitts der adulten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Dargestellt sind außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb). _____ 53

Abbildung 10: Histologische Übersichts- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere einer Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. _____ 54

Abbildung 11: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der adulten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Dargestellt werden außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb). _____ 56

Abbildung 12: Histologische Übersichts- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere der unstimulierten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. _____ 57

Abbildung 13: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der stimulierten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Dargestellt sind außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb). _____ 59

Abbildung 14: Histologische Übersichts- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere der stimulierten Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. _____ 60

Abbildung 15: Übersichts- und Detailaufnahme der dreidimensionalen Rekonstruktion der Glattmuskel- (rot) und Renin- (grün) Immunfluoreszenz eines repräsentativen Gefäßbaumabschnitts der stimulierten Tie-2^{+/-Cre}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Dargestellt werden außerdem Glomeruli (weißlich-gelb) und Kapsel (gelb). _____ 62

Abbildung 16: Histologische Übersichts- und Detailaufnahme eines Teilausschnitts der Niere der stimulierten PDGF Tie-2^{+/+}-PDGF-BB^{fl/fl}-Maus. Immunfluoreszenzfärbung von Glattmuskelaktin (rot) und Renin (grün), Pfeile markieren exemplarisch die typische juxtaglomeruläre Position reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen. G = Glomerulus. _____ 63

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Biologische und chemische Einheiten und Größen

bp	Basenpaare
I.E.	Internationale Einheit
M	Molare Masse
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
U	Unit (enzymatische Einheit)

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo (1×10^3)
m	milli (1×10^{-3})
μ	micro (1×10^{-6})
n	nano (1×10^{-9})
p	pico (1×10^{-12})

Physikalische Einheiten und Größen

°C	Grad Celsius
d	Tag(e)
g	Gramm
h	Stunde(n)
l	Liter
min	Minute(n)
M	Mol
s	Sekunde(n)
V	Volt

Sonstige Abkürzungen

3D	dreidimensional
α SMA	α smooth muscle actin (α -Glattmuskelaktin)
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADH	antidiuretisches Hormon
ACE	angiotensin converting enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANG I/II	Angiotensin I/II
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
AT _{1/2} -Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1/2
AQP	Aquaporin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy/complementary DNA
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	calcitonin gene-related peptide
Cl ⁻	Chlorid
Cy2	Carbocyanin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
et al.	et alii (und andere)
GAP	GTPase activating protein

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HB-EGF	heparin-binding epidermal growth factor
HS	horse serum (Pferdeserum)
IPN	isoliert perfundierte Niere
Ig	Immunglobulin
JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JG-Zelle	juxtaglomeruläre Zelle
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LS	Low salt (Niedrigsalzdiät)
MAP	mitogen-activated protein
MD	Macula densa
mRNA	messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
PAF	platelet activating factor
PDGF	platelet derived growth factor
PDGFR- α/β	platelet derived growth factor receptor α/β
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
pp1	erster Tag post partum
RBP-J	recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TGF- β	transforming growth factor beta

TNF α	tumor necrosis factor α
TRITC	Tetramethylrhodamin
V.	Vena
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

6.4 Literaturverzeichnis

- Abboud, H.E., Poptic, E. & DiCorleto, P. 1987. Production of platelet-derived growth factorlike protein by rat mesangial cells in culture. *J Clin Invest* **80**, 675–683.
- Alpers, C.E., Seifert, R.A., Hudkins, K.L., Johnson, R.J. & Bowen-Pope, D.F. 1992. Developmental patterns of PDGF B-chain, PDGF-receptor, and alpha-actin expression in human glomerulogenesis. *Kidney Int.* **42**, 390–399.
- Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* **22**, 1276–1312.
- Ardailou, R. 1999. Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**, S30-9.
- Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* **97**, 512–523.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. & Isner, J.M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967.
- Balla, T., Baukal, A.J., Eng, S. & Catt, K.J. 1991. Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. *Mol Pharmacol* **40**, 401–406.
- Barajas, L. 1979. Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* **237**, F333-43.
- Barnes, J.L. & Hevey, K.A. 1990. Glomerular mesangial cell migration in response to platelet-derived growth factor. *Lab Invest* **62**, 379–382.
- Barrett, T.B. & Benditt, E.P. 1987. sis (platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human atherosclerotic lesions compared to normal artery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1099–1103.
- Battegay, E.J., Rupp, J., Iruela-Arispe, L., Sage, E.H. & Pech, M. 1994. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* **125**, 917–928.
- Bell, P.D. & Lapointe, J.Y. 1997. Characteristics of membrane transport processes of macula densa cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 541–547.
- Berg, A.C., Chernavvsky-Sequeira, C., Lindsey, J., Gomez, R.A. & Sequeira-Lopez, M.L.S. 2013. Pericytes synthesize renin. *World J Nephrol* **2**, 11–16.
- Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C.H., Alitalo, K. & Eriksson, U. 2001. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 512–516.

- Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M.S., Eddy, R., Shows, T.B., Philpott, K. & Mellor, A.L. 1986. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* **320**, 695–699.
- Bishayee, S., Majumdar, S., Khire, J. & Das, M. 1989. Ligand-induced dimerization of the platelet-derived growth factor receptor. Monomer-dimer interconversion occurs independent of receptor phosphorylation. *J Biol Chem* **264**, 11699–11705.
- Bjarnegard, M., Enge, M., Norlin, J., Gustafsdottir, S., Fredriksson, S., Abramsson, A., Takemoto, M., Gustafsson, E., Fassler, R. & Betsholtz, C. 2004. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development* **131**, 1847–1857.
- Bock, H.A., Hermle, M., Brunner, F.P. & Thiel, G. 1992. Pressure dependent modulation of renin release in isolated perfused glomeruli. *Kidney Int* **41**, 275–280.
- Boivin, V., Jahns, R., Gambaryan, S., Ness, W., Boege, F. & Lohse, M.J. 2001. Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* **59**, 515–531.
- Boyle, S.C., Liu, Z. & Kopan, R. 2014. Notch signaling is required for the formation of mesangial cells from a stromal mesenchyme precursor during kidney development. *Development* **141**, 346–354.
- Carey, R.M., McGrath, H.E., Pentz, E.S., Gomez, R.A. & Barrett, P.Q. 1997. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* **100**, 1566–1574.
- Carillo, B.A., Beutel, A., Mirandola, D.A., Vidonho, A.F., JR, Furukawa, L.N.S., Casarini, D., Campos, R.R., Dolnikoff, M.S., Heimann, J.C. & Bergamaschi, C.T. 2007. Differential sympathetic and angiotensinergic responses in rats submitted to low- or high-salt diet. *Regul Pept* **140**, 5–11.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435–439.
- Castellanos Rivera, R.M., Monteagudo, M.C., Pentz, E.S., Glenn, S.T., Gross, K.W., Carretero, O., Sequeira-Lopez, M.L.S. & Gomez, R.A. 2011. Transcriptional regulator RBP-J regulates the number and plasticity of renin cells. *Physiol Genomics* **43**, 1021–1028.
- Castrop, H. 2007. Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* **189**, 3–14.
- Castrop, H., Höcherl, K., Kurtz, A., Schweda, F., Todorov, V. & Wagner, C. 2010. Physiology of kidney renin. *Physiol. Rev.* **90**, 607–673.
- Chirgwin, J.M., Schaefer, I.M., Diaz, J.A. & Lalley, P.A. 1984a. Mouse kidney renin gene is on chromosome one. *Somat Cell Mol Genet* **10**, 633–637.

- Chirgwin, J.M., Schaefer, I.M., Rotwein, P.S., Piccini, N., Gross, K.W. & Naylor, S.L. 1984b. Human renin gene is on chromosome 1. *Somat Cell Mol Genet* **10**, 415–421.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156–159.
- Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermark, B. & Heldin, C.H. 1989. cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4917–4921.
- Dalla-Favera, R., Gallo, R.C., Giallongo, A. & Croce, C.M. 1982. Chromosomal localization of the human homolog (c-sis) of the simian sarcoma virus onc gene. *Science* **218**, 686–688.
- Davis, J.O. & Freeman, R.H. 1976. Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* **56**, 1–56.
- DiBona, G.F. & Kopp, U.C. 1997. Neural control of renal function. *Physiol Rev* **77**, 75–197.
- Dickinson, D.P., Gross, K.W., Piccini, N. & Wilson, C.M. 1984. Evolution and variation of renin genes in mice. *Genetics* **108**, 651–667.
- DiCorleto, P.E. & Bowen-Pope, D.F. 1983. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1919–1923.
- Dijkmans, J., Xu, J., Masure, S., Dhanaraj, S., Gosiewska, A., Geesin, J., Sprengel, J., Harris, S., Verhasselt, P., Gordon, R. & Yon, J. 2002. Characterization of platelet-derived growth factor-C (PDGF-C): expression in normal and tumor cells, biological activity and chromosomal localization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 414–426.
- Doi, T., Vlassara, H., Kirstein, M., Yamada, Y., Striker, G.E. & Striker, L.J. 1992. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2873–2877.
- Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. & Antoniades, H.N. 1983. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* **221**, 275–277.
- Ehmke, H., Persson, P., Fischer, S., Hackenthal, E. & Kirchheim, H. 1989. Resetting of pressure-dependent renin release by intrarenal alpha 1-adrenoceptors in conscious dogs. *Pflugers Arch* **413**, 261–266.
- Ek, B., Westermark, B., Wasteson, Å. & Heldin, C.-H. 1982. Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Nature* **295**, 419–420.
- Emaduddin, M., Ekman, S., Ronnstrand, L. & Heldin, C.H. 1999. Functional co-operation between the subunits in heterodimeric platelet-derived growth factor receptor complexes. *Biochem J* **341** (Pt 3), 523–528.

- Enge, M., Bjarnegard, M., Gerhardt, H., Gustafsson, E., Kalen, M., Asker, N., Hammes, H.-P., Shani, M., Fassler, R. & Betsholtz, C. 2002. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* **21**, 4307–4316.
- Eriksson, A., Siegbahn, A., Westermarck, B., Heldin, C.H. & Claesson-Welsh, L. 1992. PDGF alpha- and beta-receptors activate unique and common signal transduction pathways. *EMBO J* **11**, 543–550.
- Fantl, W.J., Escobedo, J.A. & Williams, L.T. 1989. Mutations of the platelet-derived growth factor receptor that cause a loss of ligand-induced conformational change, subtle changes in kinase activity, and impaired ability to stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **9**, 4473–4478.
- Fellstrom, B., Klareskog, L., Heldin, C.H., Larsson, E., Ronnstrand, L., Terracio, L., Tufveson, G., Wahlberg, J. & Rubin, K. 1989. Platelet-derived growth factor receptors in the kidney--upregulated expression in inflammation. *Kidney Int* **36**, 1099–1102.
- Field, L.J. & Gross, K.W. 1985. Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6196–6200.
- Fitzsimons, J.T. 1998. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* **78**, 583–686.
- Floege, J., Eitner, F. & Alpers, C.E. 2008. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol* **19**, 12–23.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182–1186.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M.L. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66–70.
- Fredriksson, L., Li, H. & Eriksson, U. 2004. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 197–204.
- Friis, U.G., Jensen, B.L., Hansen, P.B., Andreasen, D. & Skott, O. 2000. Exocytosis and endocytosis in juxtaglomerular cells. *Acta Physiol Scand* **168**, 95–99.
- Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A.C., Abramsson, A., Calver, A.R., Bostrom, H., Willetts, K., Bertold, C.H., Heath, J.K., Betsholtz, C. & Richardson, W.D. 1999. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* **126**, 457–467.
- Fuchs, S., Germain, S., Philippe, J., Corvol, P. & Pinet, F. 2002. Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. *Am J Pathol* **161**, 717–725.
- Gambaryan, S., Wagner, C., Smolenski, A., Walter, U., Poller, W., Haase, W., Kurtz, A. & Lohmann, S.M. 1998. Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9003–9008.

- Gasparo, M. de, Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W. & Unger, T. 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 415–472.
- Gelderloos, J.A., Rosenkranz, S., Bazenet, C. & Kazlauskas, A. 1998. A role for Src in signal relay by the platelet-derived growth factor alpha receptor. *J Biol Chem* **273**, 5908–5915.
- Gerhardt, H. & Betsholtz, C. 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 15–23.
- Gnaedinger, M.P., Uehlinger, D.E., Weidmann, P., Sha, S.G., Muff, R., Born, W., Rascher, W. & Fischer, J.A. 1989. Distinct hemodynamic and renal effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin in men. *Am J Physiol* **257**, E848-54.
- Gomez, R.A., Chevalier, R.L., Everett, A.D., Elwood, J.P., Peach, M.J., Lynch, K.R. & Carey, R.M. 1990. Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **259**, F660–F665.
- Gomez, R.A., Lynch, K.R., Chevalier, R.L., Everett, A.D., Johns, D.W., Wilfong, N., Peach, M.J. & Carey, R.M. 1988. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* **254**, F900-6.
- Gomez, R.A., Lynch, K.R., Sturgill, B.C., Elwood, J.P., Chevalier, R.L., Carey, R.M. & Peach, M.J. 1989. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol* **257**, F850-8.
- Gomez, R.A. & Norwood, V.F. 1995. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. *Am J Kidney Dis* **26**, 409–431.
- Gomez, R.A., Norwood, V.F. & Tufro-McReddie, A. 1997. Development of the kidney vasculature. *Microsc. Res. Tech.* **39**, 254–260. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19971101\)39:3<254:AID-JEMT5>3.0.CO;2-K](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19971101)39:3<254:AID-JEMT5>3.0.CO;2-K).
- Grünberger, C., Obermayer, B., Klar, J., Kurtz, A. & Schweda, F. 2006. The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ. Res.* **99**, 1197–1206.
- Guron, G. & Friberg, P. 2000. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens* **18**, 123–137.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D. & Taugner, R. 1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* **70**, 1067–1116.
- Hall, J.E. 2003. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol* **24**, 27–39.
- Haniu, M., Hsieh, P., Rohde, M.F. & Kenney, W.C. 1994. Characterization of disulfide linkages in platelet-derived growth factor AA. *Arch Biochem Biophys* **310**, 433–437.

- Haniu, M., Rohde, M.F. & Kenney, W.C. 1993. Disulfide bonds in recombinant human platelet-derived growth factor BB dimer: characterization of intermolecular and intramolecular disulfide linkages. *Biochemistry* **32**, 2431–2437.
- Harlan, J.M., Thompson, P.J., Ross, R.R. & Bowen-Pope, D.F. 1986. Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *J Cell Biol* **103**, 1129–1133.
- Harrison-Bernard, L.M., Navar, L.G., Ho, M.M., Vinson, G.P. & el-Dahr, S.S. 1997. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* **273**, F170-7.
- Hauger-Kleven, J.H., Vito, E. de & Fasciolo, J.C. 1977. The effect of thyroid hormone on renin production and release by rat kidney slices. *Acta Physiol Lat Am* **27**, 37–41.
- Heldin, C.H., Ernlund, A., Rorsman, C. & Ronnstrand, L. 1989. Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem* **264**, 8905–8912.
- Heldin, C.H. & Westermark, B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **79**, 1283–1316.
- Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. & Betsholtz, C. 2001. Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* **153**, 543–554.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**, 3047–3055.
- Hesse, I.F. & Johns, E.J. 1985. The role of alpha-adrenoceptors in the regulation of renal tubular sodium reabsorption and renin secretion in the rabbit. *Br J Pharmacol* **84**, 715–724.
- Hilgers, K.F., Norwood, V.F. & Gomez, R.A. 1997. Angiotensin's role in renal development. *Semin Nephrol* **17**, 492–501.
- Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A. & D'Amore, P.A. 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* **141**, 805–814.
- Holmer, S., Eckardt, K.U., LeHir, M., Schricker, K., Riegger, G. & Kurtz, A. 1993. Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Arch* **425**, 62–67.
- Holmer, S., Rinne, B., Eckardt, K.U., Le Hir, M., Schricker, K., Kaissling, B., Riegger, G. & Kurtz, A. 1994. Role of renal nerves for the expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol* **266**, F738-45.

- Holm, I., Ollo, R., Panthier, J.J. & Rougeon, F. 1984. Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *EMBO J* **3**, 557–562.
- Hosang, M., Rouge, M., Wipf, B., Eggimann, B., Kaufmann, F. & Hunziker, W. 1989. Both homodimeric isoforms of PDGF (AA and BB) have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositol turnover. *J Cell Physiol* **140**, 558–564.
- Humphreys, B.D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P. & Duffield, J.S. 2010. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* **176**, 85–97.
- Hunt, T.K., Knighton, D.R., Thakral, K.K., Goodson, W.H.3. & Andrews, W.S. 1984. Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* **96**, 48–54.
- Ichihara, A., Suzuki, H., Murakami, M., Naitoh, M., Matsumoto, A. & Saruta, T. 1995. Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* **133**, 569–577.
- Inagami, T., Kambayashi, Y., Ichiki, T., Tsuzuki, S., Eguchi, S. & Yamakawa, T. 1999. Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 544–549.
- Inoue, T., Nonoguchi, H. & Tomita, K. 2001. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovasc Res* **51**, 470–480.
- Jensen, B.L., Kramer, B.K. & Kurtz, A. 1997. Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* **29**, 1148–1155.
- Jensen, B.L., Lehle, U., Muller, M., Wagner, C. & Kurtz, A. 1998. Interleukin-1 inhibits renin gene expression in As4.1 cells but not in native juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* **436**, 673–678.
- Kakuchi, J., Ichiki, T., Kiyama, S., Hogan, B.L., Fogo, A., Inagami, T. & Ichikawa, I. 1995. Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int* **47**, 140–147.
- Kaplan, D.R., Chao, F.C., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. & Scher, C.D. 1979. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood* **53**, 1043–1052.
- Kazlauskas, A. & Cooper, J.A. 1989. Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* **58**, 1121–1133.
- Kazlauskas, A. & Cooper, J.A. 1990. Phosphorylation of the PDGF receptor beta subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3 kinase. *EMBO J* **9**, 3279–3286.
- Kazlauskas, A., Durden, D.L. & Cooper, J.A. 1991. Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regul* **2**, 413–425.

- Keeton, T.K. & Campbell, W.B. 1980. The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* **32**, 81–227.
- Kim, H.S., Maeda, N., Oh, G.T., Fernandez, L.G., Gomez, R.A. & Smithies, O. 1999. Homeostasis in mice with genetically decreased angiotensinogen is primarily by an increased number of renin-producing cells. *J Biol Chem* **274**, 14210–14217.
- Kim, S.M., Chen, L., Faulhaber-Walter, R., Oppermann, M., Huang, Y., Mizel, D., Briggs, J.P. & Schnermann, J. 2007. Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* **50**, 103–109.
- Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A. & Yanagisawa, M. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* **230**, 230–242.
- Klar, J., Sandner, P., Muller, M.W.H. & Kurtz, A. 2002. Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* **444**, 335–344.
- Klar, J., Vitzthum, H. & Kurtz, A. 2004. Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **286**, F349–F355.
- Kon, Y. 1999. Comparative study of renin-containing cells. Histological approaches. *J Vet Med Sci* **61**, 1075–1086.
- Kourembanas, S., Morita, T., Liu, Y. & Christou, H. 1997. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* **51**, 438–443.
- Kurtz, A. 1986. Transmembrane signalling of atrial natriuretic peptide in rat renal juxtaglomerular cells. *Klin Wochenschr* **64 Suppl 6**, 37–41.
- Kurtz, A. 1989. Cellular control of renin secretion. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Volume 113*, pp. 1–40. Springer Berlin Heidelberg.
- Kurtz, A., Della Bruna, R., Pratz, J. & Caverio, I. 1988. Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *J Cardiovasc Pharmacol* **12**, 658–663.
- Kurtz, A., Kaissling, B., Busse, R. & Baier, W. 1991. Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* **88**, 1147–1154.
- Kurtz, A. & Wagner, C. 1998. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* **275**, F849–62.
- Langan, E.M.3., Youkey, J.R., Elmore, J.R., Franklin, D.P. & Singer, H.A. 1994. Regulation of MAP kinase activity by growth stimuli in vascular smooth muscle. *J Surg Res* **57**, 215–220.

- Lapointe, J.Y., Bell, P.D. & Cardinal, J. 1990. Direct evidence for apical Na⁺:2Cl⁻:K⁺ cotransport in macula densa cells. *Am J Physiol* **258**, F1466-9.
- LaRoche, W.J., Jeffers, M., McDonald, W.F., Chillakuru, R.A., Giese, N.A., Lokker, N.A., Sullivan, C., Boldog, F.L., Yang, M., Vernet, C., Burgess, C.E., Fernandes, E., Deegler, L.L., Rittman, B., Shimkets, J. & Shimkets, R.A. *et al.* 2001. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 517–521.
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. & Betsholtz, C. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* **8**, 1875–1887.
- Li, B., Sharpe, E.E., Maupin, A.B., Teleron, A.A., Pyle, A.L., Carmeliet, P. & Young, P.P. 2006. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* **20**, 1495–1497.
- Limbourg, F.P. 2005. Essential Role of Endothelial Notch1 in Angiogenesis. *Circulation* **111**, 1826–1832.
- Lindahl, P., Hellström, M., Kalén, M., Karlsson, L., Pekny, M., Pekna, M., Soriano, P. & Betsholtz, C. 1998. Paracrine PDGF-B/PDGF-Rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* **125**, 3313–3322.
- Lindahl, P., Johansson, B.R., Levéen, P. & Betsholtz, C. 1997. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242–245.
- Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellstrom, M., Backstrom, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nystrom, H.C., Bergstrom, G., Dejana, E., Ostman, A., Lindahl, P. & Betsholtz, C. 2003. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* **17**, 1835–1840.
- Linder, B.L., Chernoff, A., Kaplan, K.L. & Goodman, D.S. 1979. Release of platelet-derived growth factor from human platelets by arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4107–4111.
- Lin, E.E., Sequeira-Lopez, M.L.S. & Gomez, R.A. 2014. RBP-J in FOXD1+ renal stromal progenitors is crucial for the proper development and assembly of the kidney vasculature and glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **306**, F249-58.
- Lin, S.Y. & Goodfriend, T.L. 1970. Angiotensin receptors. *Am J Physiol* **218**, 1319–1328.
- Li, X., Pontén, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Bäckström, G., Hellström, M., Boström, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C.H., Alitalo, K., Ostman, A. & Eriksson, U. 2000. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat. Cell Biol.* **2**, 302–309.
- Lorenz, J.N., Weihprecht, H., Schnermann, J., Skott, O. & Briggs, J.P. 1991. Renin release from isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa chloride transport. *Am J Physiol* **260**, F486-93.

- Lumbers, E.R. 1999. Angiotensin and aldosterone. *Regulatory Peptides* **80**, 91–100.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167011599000269>.
- Machura, K., Steppan, D., Neubauer, B., Alenina, N., Coffman, T.M., Facemire, C.S., Hilgers, K.F., Eckardt, K.-U., Wagner, C. & Kurtz, A. 2009. Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F1371–80.
- Makanya, A.N., Stauffer, D., Ribatti, D., Burri, P.H. & Djonov, V. 2005. Microvascular growth, development, and remodeling in the embryonic avian kidney: the interplay between sprouting and intussusceptive angiogenic mechanisms. *Microsc Res Tech* **66**, 275–288.
- Marchant, C., Brown, L. & Sernia, C. 1993. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **22**, 449–455.
- Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J. & Aaronson, S. 1989. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* **243**, 800–804.
- Mattot, V., Moons, L., Lupu, F., Chernavvsky, D., Gomez, R.A., Collen, D. & Carmeliet, P. 2002. Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1548–1560.
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R. & Gridley, T. 2001a. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* **128**, 491–502.
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R. & Gridley, T. 2001b. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* **128**, 491–502.
- Meliss, R.R., Pethig, K., Steinhoff, G., Harringer, W., Heublein, B., Choritz, H. & Haverich, A. 1999. Platelet-derived growth factor rather than basic fibroblast growth factor and vascular endothelial cell growth factor is involved in adventitial narrowing causing vascular stenosis in end-stage cardiac allograft vasculopathy. *Transplant Proc* **31**, 89–90.
- Menard, J., Bouhnik, J., Clauser, E., Richoux, J.P. & Corvol, P. 1983. Biochemistry and regulation of angiotensinogen. *Clin Exp Hypertens A* **5**, 1005–1019.
- Mene, P., Abboud, H.E., Dubyak, G.R., Scarpa, A. & Dunn, M.J. 1987. Effects of PDGF on inositol phosphates, Ca²⁺, and contraction of mesangial cells. *Am J Physiol* **253**, F458–63.
- Miyata, N., Park, F., Li, X.F. & Cowley, A.W., JR 1999. Distribution of angiotensin AT1 and AT2 receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* **277**, F437–46.
- Morrow, D., Guha, S., Sweeney, C., Birney, Y., Walshe, T., O'Brien, C., Walls, D., Redmond, E.M. & Cahill, P.A. 2008. Notch and Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Circulation Research* **103**, 1370–1382.

- Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K.i., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K. & Imaizumi, T. 2000. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* **105**, 1527–1536.
- Murphy, T.J., Alexander, R.W., Griendling, K.K., Runge, M.S. & Bernstein, K.E. 1991. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* **351**, 233–236.
- Murray-Rust, J., McDonald, N.Q., Blundell, T.L., Hosang, M., Oefner, C., Winkler, F. & Bradshaw, R.A. 1993. Topological similarities in TGF-beta 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* **1**, 153–159.
- Nafz, B., Berthold, H., Ehmke, H., Hackenthal, E., Kirchheim, H.R. & Persson, P.B. 1997. Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am J Physiol* **273**, F200–5.
- Neubauer, B., Machura, K., Schnermann, J. & Wagner, C. 2011. Renin expression in large renal vessels during fetal development depends on functional beta1/beta2-adrenergic receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* **301**, F71–7.
- Neubauer, B., Machura, K., Rupp, V., Tallquist, M.D., Betsholtz, C., Sequeira-Lopez, M.L.S., Ariel Gomez, R. & Wagner, C. 2013. Development of renal renin-expressing cells does not involve PDGF-B-PDGFR- β signaling. *Physiol Rep* **1**, n/a.
<http://dx.doi.org/10.1002/phy2.132>.
- NG, K.K.F. & Vane, J.R. 1967. Conversion of Angiotensin I to Angiotensin II. *Nature* **216**, 762–766. <http://dx.doi.org/10.1038/216762a0>.
- Nicosia, R.F., Nicosia, S.V. & Smith, M. 1994. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* **145**, 1023–1029.
- Nilsson, J., Sjolund, M., Palmberg, L., Thyberg, J. & Heldin, C.H. 1985a. Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4418–4422.
- Nilsson, J., Sjolund, M., Palmberg, L., Thyberg, J. & Heldin, C.H. 1985b. Arterial smooth muscle cells in primary culture produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4418–4422.
- Ohlsson, R., Falck, P., Hellstrom, M., Lindahl, P., Bostrom, H., Franklin, G., Ahrlund-Richter, L., Pollard, J., Soriano, P. & Betsholtz, C. 1999. PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev Biol* **212**, 124–136.
- Ortiz-Capisano, M.C., Ortiz, P.A., Harding, P., Garvin, J.L. & Beierwaltes, W.H. 2007. Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension* **49**, 162–169.

- Ostman, A., Thyberg, J., Westermark, B. & Heldin, C.H. 1992. PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *J Cell Biol* **118**, 509–519.
- Ozono, R., Wang, Z.Q., Moore, A.F., Inagami, T., Siragy, H.M. & Carey, R.M. 1997. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* **30**, 1238–1246.
- Pan, L., Glenn, S.T., Jones, C.A. & Gross, K.W. 2005a. Activation of the rat renin promoter by HOXD10.PBX1b.PREP1, Ets-1, and the intracellular domain of notch. *J Biol Chem* **280**, 20860–20866.
- Pan, L., Wang, Y., Jones, C.A., Glenn, S.T., Baumann, H. & Gross, K.W. 2005b. Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F117–24.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. & Kreutz, R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* **86**, 747–803.
- Paxton, W.G., Runge, M., Horaist, C., Cohen, C., Alexander, R.W. & Bernstein, K.E. 1993. Immunohistochemical localization of rat angiotensin II AT1 receptor. *Am J Physiol* **264**, F989–95.
- Pentz, E.S., Moyano, M.A., Thornhill, B.A., Sequeira Lopez, M.L.S. & Gomez, R.A. 2004. Ablation of renin-expressing juxtaglomerular cells results in a distinct kidney phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R474–83.
- Peters, J. & Clausmeyer, S. 2002. Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 1561–1568.
- Pfeilschifter, J., Kurtz, A. & Bauer, C. 1985. Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylgllycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* **127**, 903–910.
- Pickett, J.A. & Edwardson, J.M. 2006. Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* **7**, 109–116.
- Porter, J.P., Reid, I.A., Said, S.I. & Ganong, W.F. 1982. Stimulation of renin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Am J Physiol* **243**, F306–10.
- Raines, E.W. 2004. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**, 237–254.
- Rand, L.I. 1981. Recent advances in diabetic retinopathy. *Am J Med* **70**, 595–602.
- Reddi, V., Zaglul, A., Pentz, E.S. & Gomez, R.A. 1998. Renin-expressing cells are associated with branching of the developing kidney vasculature. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 63–71.
- Reynolds, L.P. & Redmer, D.A. 2001. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* **64**, 1033–1040.

- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671–674.
- Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funa, K. & Heldin, C.H. 1992. Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors* **7**, 261–266.
- Risau, W. & Ekblom, P. 1986. Production of a heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. *J Cell Biol* **103**, 1101–1107.
- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R. & Doetschman, T. 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**, 471–478.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. & Harker, L. 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 1207–1210.
- Ryan, M.J., Gross, K.W. & Hajduczuk, G. 2000. Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E823-9.
- Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkilä, P., Jaaskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., Euler, G. von, Eriksson, U., Alitalo, K. & Joensuu, H. 1998. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* **153**, 103–108.
- Sariola, H., Saarma, M., Sainio, K., Arumae, U., Palgi, J., Vaahtokari, A., Thesleff, I. & Karavanov, A. 1991. Dependence of kidney morphogenesis on the expression of nerve growth factor receptor. *Science* **254**, 571–573.
- Saussine, C., Judes, C., Massfelder, T., Musso, M.J., Simeoni, U., Hannedouche, T. & Helwig, J.J. 1993. Stimulatory action of parathyroid hormone on renin secretion in vitro: a study using isolated rat kidney, isolated rabbit glomeruli and superfused dispersed rat juxtaglomerular cells. *Clin Sci (Lond)* **84**, 11–19.
- Sauter, A., Machura, K., Neubauer, B., Kurtz, A. & Wagner, C. 2008. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int* **73**, 43–51.
- Schlesinger, T.K., Demali, K.A., Johnson, G.L. & Kazlauskas, A. 1999. Platelet-derived growth factor-dependent association of the GTPase-activating protein of Ras and Src. *Biochem J* **344 Pt 2**, 519–526.
- (ed)Schmidt, R.F. 2010. Physiologie des Menschen. Heidelberg. Springer.
- Schnermann, J. 1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* **274**, R263-79.
- Schnermann, J. & Levine, D.Z. 2003. Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu Rev Physiol* **65**, 501–529.

- Scholz, H. & Kurtz, A. 1993. Involvement of endothelium-derived relaxing factor in the pressure control of renin secretion from isolated perfused kidney. *J Clin Invest* **91**, 1088–1094.
- Schutz, S., Le Moullec, J.M., Corvol, P. & Gasc, J.M. 1996. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol* **149**, 2067–2079.
- Schweda, F., Friis, U., Wagner, C., Skott, O. & Kurtz, A. 2007. Renin release. *Physiology (Bethesda)* **22**, 310–319.
- Seifert, R.A., Hart, C.E., Phillips, P.E., Forstrom, J.W., Ross, R., Murray, M.J. & Bowen-Pope, D.F. 1989. Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors. *J Biol Chem* **264**, 8771–8778.
- Seifert, R.A., Schwartz, S.M. & Bowen-Pope, D.F. 1984. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature* **311**, 669–671.
- Sequeira Lopez, M.L., Pentz, E.S., Robert, B., Abrahamson, D.R. & Gomez, R.A. 2001. Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F345–56.
- Sequeira Lopez, M.L.S. & Gomez, R.A. 2011. Development of the renal arterioles. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 2156–2165.
- Sequeira Lopez, M.L.S., Pentz, E.S., Nomasa, T., Smithies, O. & Gomez, R.A. 2004. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell* **6**, 719–728.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L. & Schuh, A.C. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62–66.
- Share, L. 1988. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev* **68**, 1248–1284.
- Shultz, P.J., DiCorleto, P.E., Silver, B.J. & Abboud, H.E. 1988. Mesangial cells express PDGF mRNAs and proliferate in response to PDGF. *Am J Physiol* **255**, F674–84.
- Shure, D., Senior, R.M., Griffin, G.L. & Deuel, T.F. 1992. PDGF AA homodimers are potent chemoattractants for fibroblasts and neutrophils, and for monocytes activated by lymphocytes or cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1510–1514.
- Siegbahn, A., Hammacher, A., Westermarck, B. & Heldin, C.H. 1990. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* **85**, 916–920.
- Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Kahn, J.R., Shumway, N.P. & Woods, K.R. 1956. The amino acid sequence of hypertensin II. *J. Exp. Med.* **104**, 193–197.

- Skinner, S.L., McCubbin, J.W. & Page, I.H. 1963. Renal Baroreceptor control of renin secretion. *Science* **141**, 814–816.
- Skott, O. & Briggs, J.P. 1987. Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* **237**, 1618–1620.
- Soriano, P. 1994. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* **8**, 1888–1896.
- Soundararajan, R., Pearce, D. & Ziera, T. 2012. The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport. *Mol Cell Endocrinol* **350**, 242–247.
- Spritz, R.A., Strunk, K.M., Lee, S.T., Lu-Kuo, J.M., Ward, D.C., Le Paslier, D., Altherr, M.R., Dorman, T.E. & Moir, D.T. 1994. A YAC contig spanning a cluster of human type III receptor protein tyrosine kinase genes (PDGFRA-KIT-KDR) in chromosome segment 4q12. *Genomics* **22**, 431–436.
- Steppan, D., Zügner, A., Rachel, R. & Kurtz, A. 2012. Structural analysis suggests that renin is released by compound exocytosis. *Kidney Int* **83**, 233–241.
- Stratman, A.N. & Davis, G.E. 2012a. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microsc. Microanal.* **18**, 68–80.
- Stratman, A.N. & Davis, G.E. 2012b. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microsc Microanal* **18**, 68–80.
- Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J. & Davis, G.E. 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* **114**, 5091–5101.
- Stratman, A.N., Schwindt, A.E., Malotte, K.M. & Davis, G.E. 2010. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood* **116**, 4720–4730.
- Sugimoto, T., Saito, M., Mochizuki, S., Watanabe, Y., Hashimoto, S. & Kawashima, H. 1994. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J Biol Chem* **269**, 27088–27092.
- Sundberg, C., Ljungstrom, M., Lindmark, G., Gerdin, B. & Rubin, K. 1993. Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* **143**, 1377–1388.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. & Yancopoulos, G.D. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171–1180.
- Tallquist, M. & Kazlauskas, A. 2004. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 205–213.

- Taugner, R., Bührle, C.P., Hackenthal, E., Mannek, E. & Nobiling, R. 1984. Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib Nephrol* **43**, 76–101.
- Tigerstedt, R. & Bergman, P.Q. 1898. Niere und Kreislauf I. *Skandinavisches Archiv Für Physiologie* **8**, 223–271.
- Todorov, V., Muller, M., Schweda, F. & Kurtz, A. 2002. Tumor necrosis factor- α inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R1046–51.
- Tufro, A., Norwood, V.F., Carey, R.M. & Gomez, R.A. 1999. Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2125–2134.
- Tufro-McReddie, A., Norwood, V.F., Aylor, K.W., Botkin, S.J., Carey, R.M. & Gomez, R.A. 1997. Oxygen regulates vascular endothelial growth factor-mediated vasculogenesis and tubulogenesis. *Dev Biol* **183**, 139–149.
- Uutela, M., Laurén, J., Bergsten, E., Li, X., Horelli-Kuitunen, N., Eriksson, U. & Alitalo, K. 2001. Chromosomal location, exon structure, and vascular expression patterns of the human PDGFC and PDGFD genes. *Circulation* **103**, 2242–2247.
- van Dongen, R. & Peart, W.S. 1974. Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br J Pharmacol* **50**, 125–129.
- Vandongen, R., Peart, W.S. & Boyd, G.W. 1973. Andrenergic stimulation of renin secretion in the isolated perfused rat kidney. *Circ Res* **32**, 290–296.
- Wagner, C., Jobs, A., Schweda, F., Kurtz, L., Kurt, B., Lopez, M.L.S., Gomez, R.A., van Veen, T.A.B., Wit, C. de & Kurtz, A. 2010. Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. *Kidney Int* **78**, 762–768.
- Wagner, C. & Kurtz, A. 1998. Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**, 437–441.
- Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F. & Kurtz, A. 1998. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* **102**, 1576–1582.
- Wallace, K.B., Bailie, M.D. & Hook, J.B. 1978. Angiotensin-converting enzyme in developing lung and kidney. *Am J Physiol* **234**, R141–5.
- Westermarck, B., Siegbahn, A., Heldin, C.H. & Claesson-Welsh, L. 1990. B-type receptor for platelet-derived growth factor mediates a chemotactic response by means of ligand-induced activation of the receptor protein-tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 128–132.
- Yao, R. & Cooper, G.M. 1995. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**, 2003–2006.
- Yarden, Y., Escobedo, J.A., Kuang, W.-J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, U., Fried, V.A., Ullrich, A. & Williams,

- L.T. 1986. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* **323**, 226–232.
<http://dx.doi.org/10.1038/323226a0>.
- Yokote, K., Mori, S., Siegbahn, A., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Heldin, C.H. & Claesson-Welsh, L. 1996. Structural determinants in the platelet-derived growth factor alpha-receptor implicated in modulation of chemotaxis. *J Biol Chem* **271**, 5101–5111.
- Yosipiv, I.V. & el-Dahr, S.S. 1996. Activation of angiotensin-generating systems in the developing rat kidney. *Hypertension* **27**, 281–286.
- Zhang, Y., Morgan, T. & Read, G. 1992. The role of the renal nerves in renin synthesis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **19**, 827–831.
- Zini, S., Fournie-Zaluski, M.C., Chauvel, E., Roques, B.P., Corvol, P. & Llorens-Cortes, C. 1996. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11968–11973.

6.5 Erklärung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von März 2012 bis Juni 2015 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner und unter der Betreuung von Herrn Dr. Björn Neubauer am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 20.06.2016

Verena Rupp

6.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für die Bereitstellung des Themas, von Arbeitsmitteln und Geräten. Ihre Ideen, ihr Interesse und die stets herzliche Betreuung trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Herrn Dr. Björn Neubauer möchte ich mich für die fachliche Anleitung, seine Hilfsbereitschaft, sein Interesse und seine Geduld sehr herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten Team des Lehrstuhls für Physiologie bedanken. Insbesondere Frau Dr. Katharina Machura, Frau Anna M'Bangui und Frau Gerda Treuner gilt mein Dank für ihre Geduld und ihre Hilfe bei der Arbeit im Labor.

Bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, vielseitige und liebevolle Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.